

面向 21 世纪课程教材

Textbook Series for 21st Century

现代食品生物技术

陆兆新 主编

食品科学与工程专业用

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

现代食品生物技术 / 陆兆新主编. —北京: 中国农业出版社, 2002.8

面向 21 世纪课程教材

ISBN 7-109-07763-2

I. 现... II. 陆... III. 生物技术—应用—食品工业—高等学校—教材 IV. TS201.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 039760 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

出版人: 傅玉祥

责任编辑 李国忠

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2002 年 8 月第 1 版 2002 年 8 月北京第 1 次印刷

开本: 850mm×1168mm 1/16 印张: 27.75

字数: 668 千字

定价: 38.60 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

主 编 陆兆新 (南京农业大学)
副 主 编 郑晓冬 (浙江大学)
陈福生 (华中农业大学)
陈崇顺 (南京师范大学)
参编人员 别小妹 (南京农业大学)
方维明 (扬州大学)
吕淑霞 (沈阳农业大学)
汪 昭 (浙江工业大学)
樊黎生 (湖北工学院)
主 审 周德庆 (复旦大学)

前言

本教材被教育部批准列入高等教育“面向 21 世纪课程教材”。

生物技术是一门具有悠久历史的学科，可追溯到古代食品的生产，如酿酒、制饴等。生物技术在 20 世纪发展非常迅速，特别是 20 世纪六七十年代原生质融合技术、DNA 重组技术和近年来基因组学、蛋白质组学的发展，更赋予生物技术以崭新的内容而被列为当前高技术的领域，受到世界各国的高度重视。同时，现代生物技术在医药卫生、环境治理、农业、化工以及食品生产和加工领域得到广泛的应用，并取得了巨大的社会效益，对社会发展和经济发展做出了巨大的贡献。因此现代食品生物技术将对于优质农产品原料生产、食品加工、食品质量控制、食品生产废弃物的利用以及改善和增加食品的营养价值等具有重要的意义。

为了适应时代发展的要求和学生对知识的需要，国内迫切需要一本从现代生物技术的基本原理到食品应用进行深入介绍的教材。在全国高等农业院校食品科学与工程教学指导委员会的指导下，我们组织编写了食品科学与工程专业的教材《现代食品生物技术》。本教材是在南京农业大学和华中农业大学食品学院试用教材的基础上，编写人员根据国内外现代食品生物技术的新进展，进行了充实和提高编写而成的。例如，在教材中介绍了近几年来生物技术最新进展——分子进化工程理论及其在酶分子进化中的应用实践，拓展酶在食品领域的应用前景。另外，考虑到食品科学和工程专业学生对生物技术基本原理了解比较少的实际情况，尽可能深入浅出介绍现代生物技术的基本原理及其在食品中的应用。

本书编写人员均为各院校生物技术领域的教师，多数是从国外留学回国的具有博士学位的年轻教师，对国内外食品生物技术的发展趋势有比较全面的了解，并结合各人在自己领域多年的教学和科研经验。南京农业大学的陆兆新为本教材主编，浙江大学的郑晓冬、华中农业大学的陈福生和南京师范大学的陈崇顺为副主编，参加编写的还有南京农业大学的别小妹、扬州大学的方维明、沈阳农业大学的吕淑霞、浙江工业大学的汪昭和湖北工学院的樊黎生。全书由复旦大学的周德庆教授主审。

在编写过程中参考了国内外相关书籍和近期的文献，谨此向原作者致谢。由于能力和时间有限，书中难免会出现许多遗漏或错误及不足之处，敬请读者批评指正。

编者

2002 年 6 月

目 录

前 言

第一章 绪 论

第一节 生物技术的定义和研究内容	1
一、生物技术的定义	1
二、生物技术的构成	2
三、生物技术各构成成分之间的关系	3
第二节 生物技术的形成和发展	3
一、传统生物技术	3
二、现代生物技术的发展	5
三、现代生物技术的前景	6
第三节 食品生物技术的基本特征和研究内容	8
一、食品生物技术的基本特征	8
二、食品生物技术的研究内容	8
三、现代食品生物技术的作用	8
主要参考文献	11

第二章 基因工程原理及其在食品科学中的应用

第一节 基因工程基础	13
一、基因工程的定义、意义及研究内容	13
二、基因工程的工具酶	14
三、基因工程的载体	26
四、基因工程中的一些主要分子生物学方法	39
第二节 基因工程研究	50
一、目的基因的分离与制备	50
二、目的基因与载体的重组（重组体的构建）	53
三、将重组体导入受体细胞（重组转化体的获得）	55
四、重组转化体的筛选和鉴定	58
五、克隆基因的表达	61

第三节 基因工程在食品科学中的应用	64
一、基因工程与动物、植物和微生物产品品质的改良	64
二、基因工程与植物产品贮藏保鲜	71
三、基因工程与食品新资源的开发	73
主要参考文献	73

第三章 发酵工程原理及其在食品工业中的应用

第一节 概 述	76
一、发酵工程的定义	76
二、发酵工程的发展简史	76
三、发酵工艺及方法简介	78
第二节 培养基的组成及制备	80
一、培养基的类型	80
二、培养基的配制原则	81
三、发酵工业中常用的原料	83
四、最佳培养基的确定	85
五、培养基的灭菌	85
第三节 菌种活化与扩大培养	91
一、实验室种子制备	92
二、生产车间种子制备	93
三、菌种质量的要求	94
第四节 空气除菌	95
一、通气发酵对无菌空气的要求	95
二、除菌方法	96
第五节 发酵工艺控制	98
一、温度对发酵的影响及控制	100
二、溶解氧浓度对发酵的影响及监控	101
三、pH 对发酵的影响及控制	106
四、二氧化碳对发酵的影响及控制	107
五、发酵过程的中间补料控制	108
六、泡沫控制	109
七、发酵终点判断	111
八、发酵过程计算机控制	111
第六节 微生物发酵动力学	113
一、发酵动力学概论	113
二、分批培养动力学	114

三、补料分批发酵动力学	119
四、连续发酵动力学	120
第七节 细胞生物反应器	123
一、液体发酵罐	123
二、固体发酵设备	131
第八节 发酵工程与功能性食品	133
一、真菌多糖	133
二、生物活性肽	139
三、功能性微生态制剂	141
四、发酵法生产功能性微量元素	143
五、功能性不饱和脂肪酸	145
第九节 发酵工程与食品添加剂	148
一、黄原胶的发酵法生产	149
二、结冷胶的发酵法生产	155
三、茁霉多糖的发酵法生产	159
四、海藻糖的发酵法生产	162
五、乳酸的发酵法生产	164
六、红曲的发酵法生产	167
七、发酵法生产类胡萝卜素	169
第十节 发酵工程与食品废弃物的处理	172
一、食品工业废水分类及特性	172
二、食品工业废水的处理方法	174
三、食品工业废水生物处理的应用	177
主要参考文献	183

第四章 酶工程原理及其在食品中的应用

第一节 酶工程原理和方法	185
一、酶工程概述	185
二、酶制剂的生产	186
三、微生物细胞的破碎	186
四、酶的提取与纯化	187
五、酶的改造与修饰	196
六、酶的固定化	200
七、酶反应器	203
第二节 酶工程与食品加工	205
一、淀粉糖加工	205

二、乳品加工	206
三、果蔬加工	209
四、鱼、肉制品加工	211
五、油脂改良	211
六、酒的酿造	213
七、焙烤食品	214
第三节 酶工程与食品添加剂	215
一、高甜度甜味剂	215
二、5'-鸟苷酸和 5'-肌苷酸	217
三、单甘酯	217
四、 β -环糊精	219
第四节 酶工程与功能性食品配料	220
一、低聚糖	220
二、果葡糖浆	223
三、水解动植物蛋白	224
第五节 酶工程与食品原料的改良	227
一、小麦面粉品质的改良	227
二、水果类加工品质的改良	229
三、牛乳品质的改良	231
四、蛋白质功能性质的改良	232
五、某些有毒食品原料的改良	232
第六节 酶工程提高食品资源利用效率	233
一、提高肉类和果蔬类生产效率	233
二、提高植物原料的淀粉提取率	233
三、酿酒工业与出酒率的提高	234
四、提高农副产品和城市废料中纤维素的利用率	235
五、提高肉类和鱼类的利用率	235
六、酶与提高发泡剂的保存质量	236
七、提高干酪的生产效率	236
八、酶与提高酿造产品的得率及原料利用率	237
九、酶技术使淀粉的转化利用率更高	237
十、酶制剂与提高茶叶等原料中有效成分的得率	238
十一、酶制剂与提高豆制品的得率	238
十二、酶制剂与草莓、辣椒等除蒂率的提高	239
十三、酶制剂与琼脂生产	239
十四、其他用途	239
第七节 新型酶制剂及其应用	239

一、微生物原果胶酶的研究进展	239
二、转谷氨酰胺酶的功能特性及其应用	242
三、 α -乙酰乳酸脱羧酶	243
四、氨肽酶和羧肽酶及其在蛋白水解物脱苦中的应用	245
主要参考文献	247

第五章 细胞工程原理及其在食品工业中的应用

第一节 细胞工程原理	252
一、细胞工程概述	252
二、细胞工程的主要技术领域	253
三、细胞工程产业化的实现	258
第二节 微生物细胞工程及其在食品工业中的应用	259
一、微生物原生质体融合的优点	260
二、微生物细胞融合	260
三、微生物细胞融合技术在食品工业中的应用	264
第三节 动物细胞工程及其在食品工业中的应用	266
一、核移植技术	266
二、动物细胞培养及其应用	271
三、其他细胞工程技术在相关食品工业中的应用	273
第四节 植物细胞工程及其在食品工业中的应用	275
一、植物细胞培养及其在食品工业中的应用	275
二、其他植物细胞工程技术及其在食品工业中的应用	290
主要参考文献	294

第六章 蛋白质工程和分子进化工程

第一节 蛋白质工程的原理和方法	298
一、蛋白质工程的概念与起源	298
二、蛋白质工程的原理	299
三、蛋白质工程的工作定义	301
四、蛋白质工程的主要研究方法	304
五、蛋白质工程的意义与展望	309
第二节 蛋白质工程与食品加工	310
一、葡萄糖异构酶	310
二、凝乳酶	315
三、其他分子蛋白质工程	317

第三节 分子进化工程及其在食品中的应用	320
一、分子进化工程	320
二、酶分子进化工程	324
三、酶分子进化的食品及工业应用	328
四、蛋白质进化的理论意义	329
主要参考文献	330

第七章 生物技术与食品安全和品质控制

第一节 生物传感器及其在食品检测分析中的应用	333
一、生物传感器的基本概念	333
二、生物传感器的发展简史	340
三、生物传感器中生物敏感材料的固定化和成膜技术	341
四、生物传感器在食品安全和品质控制中的应用	344
第二节 免疫学技术与食品安全检测	348
一、抗原与抗体	349
二、常用的免疫学方法	358
三、免疫技术在食品安全检测中的应用	370
第三节 分子生物学技术及其在食品安全检测中的应用	373
一、食品安全检测中常用的几种分子生物学技术简介	373
二、分子生物学技术在食品安全检测中的应用	384
第四节 生物芯片及其在食品安全检测中的应用	387
一、生物芯片的定义及分类	387
二、生物芯片的制备方法	390
三、生物芯片的应用	393
主要参考文献	397

第八章 转基因食品的发展与食品安全

第一节 转基因食品的发展动态	403
一、转基因食品的概念	403
二、转基因食品的研究开发进展	404
三、我国转基因食品的发展状况及对基因工程技术的政策	404
四、转基因食品的发展面临的困难	405
第二节 转基因食品对人类健康和社会发展的影响	406
一、转基因食品为人类带来的好处	407
二、人们对转基因食品的争论	410

第三节 转基因食品的安全性评价	412
一、转基因食品的安全问题	412
二、转基因食品的安全性要求	413
三、转基因食品安全性评价的目的	414
四、转基因食品安全性评价的原则	415
五、转基因食品安全性评价的方法	416
六、转基因食品安全性评价的几个问题	419
七、转基因食品无需担心的理由	427
第四节 转基因食品的检测	427
第五节 问题和展望	428
一、相关的法律和政策不完善	428
二、尊重消费者的知情权和选择权	429
三、树立对消费者负责的态度	429
主要参考文献	430

绪 论

当今生物技术已经被世界各国视为高技术。它对于解决人类所面临的食物短缺、健康问题、资源问题、环境问题、经济问题和人类可持续发展等问题和促进国民经济的发展是至关重要的，所以许多国家都将生物技术确定为增强国力和经济实力的关键性技术之一。我国政府同样也把生物技术列为高新技术之一，并组织力量追踪攻关，力争赶上世界先进水平或达到国际领先水平。进入 21 世纪后，生物技术更加受到重视，它必将对 21 世纪的经济发展和人们生活质量的提高产生更大的作用，因此有人认为 21 世纪是生命科学的世纪，生物技术产业将是 21 世纪的支柱产业。

第一节 生物技术的定义和研究内容

一、生物技术的定义

生物技术 (biotechnology) 的起源可追溯到古代劳动人民食品的生产。随着科学技术的发展，人类对生命的本质及生命规律的认识不断加深，生物技术的内涵得到了进一步发展。现代生物技术和传统生物技术之间既有共同之处，又有很大的差异。

现代生物技术代表着高新技术，但至今还没有一个统一的定义。而从学术方面对生物技术下定义是在 20 世纪的事。1919 年一位匈牙利农业经济学家 Karl Ereky 为了表达一切用生物转化手段进行生产的概念，并表明生物学与技术之间的内在联系，首创了“生物技术”这一名词。1933 年英国《自然》杂志第一次刊登了一篇题为《生物技术》的文章。1938 年著名科学家 Julian Huxley 认为“生物学与其他无生命物质的科学具有同等重要的意义，而生物技术从长期来看，将比力学工程和化学工程具有更重要意义。”由此使“生物技术”一词的使用出现了第一个高潮。第二次世界大战后，随着生物科学技术发展的加快，20 世纪 50~60 年代美国大学中有关 biotechnology、biochemical engineering 和 bioengineering 的研究小组、系以及杂志相继出现，如 1962 年，当时《微生物技术和微生物工程杂志》的主编、著名生化工程学家 Elmer Gaden 博士决定把这一刊物改名为《Biotechnology and Bioengineering》(生物技术和生物工程)。

曾经有不少国际学术组织和学者对生物技术下过定义。1982 年国际纯粹及应用化学联合会 (IUPAC) 对生物技术作了如下的定义：生物技术是将生物化学、生物学、微生物学和化学工程应用于工业生产过程 (包括医药、卫生、能源、农业及其产品) 及环境保护的技术。1982 年国际经济合作及发展组织 (OECD) 提出：生物技术是应用自然科学和工程学的原理，依靠生物催化剂 (酶或活细胞) 的作用对物料进行加工，以提供产品为社会服务的技术。1985 年 Moo-Young 主编的《综合生物技术》中把生物技术定义为：生物技术是对生物作用和生物物料加以评价和应用，并进行工业产品

生产的技术。生物技术的英文对应词 biotechnology 中的 bio-是生命或生物的意思，即植物、动物和微生物等具有生命活动的细胞；而 technology 是指技术和工艺，因此，生物技术是指利用培养基中（上）活细胞，并整合其他加工工艺，以获得生理活性物质和对物质进行生物加工，达到最大的商业价值的技术学科。

国际上比较权威的定义为：生物技术是利用生物体系，应用先进的生物学和工程技术，加工或不加工底物原料，以提供所需的各种产品，或达到某种目的的一门新型跨学科技术。

传统生物技术的技术特征是酿造技术和发酵技术。而现代生物技术的技术特征是以重组 DNA 技术为核心的一个综合技术体系，其内容主要包括：①重组 DNA 技术及其他转基因技术；②细胞和原生质融合技术；③酶和细胞固定化技术；④植物脱毒和快速繁殖技术；⑤动物和植物细胞大量培养技术；⑥动物胚胎工程技术；⑦现代微生物发酵技术（高密度发酵、连续发酵和其他新型发酵技术）；⑧现代生物反应工程和分离工程；⑨蛋白质工程；⑩分子进化工程。

二、生物技术的构成

生物技术是由多学科综合而成的一门交叉性学科，涉及微生物学、生物化学、细胞生物学、免疫学、遗传育种、分子生物学和化学工程等学科。目前认为生物技术是由基因工程、细胞工程、发酵工程、酶工程和蛋白质工程组成。

（一）基因工程

基因工程（gene engineering）是 20 世纪 70 年代以后兴起的一门新技术，其主要原理是应用人工方法把生物遗传物质——DNA 分离出来，在体外进行切割、拼接和重组，然后通过运载工具（vector）将重组的基因导入某种宿主细胞或个体，从而改变宿主的遗传特性；有时还使导入的新的遗传信息在宿主细胞中或个体中大量表达，以获得大量所需的基因表达产物（各种生理活性物质，如蛋白质、酶、多肽、抗生素等等）。这种利用 DNA 重组技术来创造新物种或给予生物以特殊概念的技术称基因工程，也称 DNA 重组技术。

（二）细胞工程

所谓细胞工程（cell engineering）是指以细胞为基本单位，在体外条件下进行培养、繁殖或人为地使细胞的某些生物学特性按人们的意志发生改变，从而达到改良生物品种和创造新品种，加速动物或植物个体的繁殖，或获得某些有用的物质的过程。它包括了动物和植物细胞的体外大量培养技术、细胞融合技术（也称细胞杂交技术）、细胞拆分、染色体工程和繁殖生物学技术等。

（三）发酵工程

利用微生物生长速度快、生长条件简单以及代谢过程特殊等特点，在合适条件下，通过现代化工程技术手段，最大限度地发挥微生物的某种特定功能，以生产出人类所需的产品称为发酵工程（fermentation engineering），也称微生物工程。它包括了微生物生长动力学，发酵条件的优化和控制，生化反应器的设计，以及产品的分离、提取和精制等技术。

（四）酶工程

所谓酶工程（enzyme engineering）是指利用酶、细胞器或细胞所具有的特异催化功能，或对

酶结构进行修饰改造，并借助于生物反应器和工艺优化过程，有效地发挥酶的催化特性来生产人类所需产品的技术。它包括酶固定化技术、细胞固定化技术、酶化学修饰技术和酶反应器设计等技术。

（五）蛋白质工程和分子进化工程

蛋白质工程（protein engineering）是指应用基因工程的原理，结合蛋白质结晶学、计算机模拟设计和蛋白质化学等多学科的知识，通过蛋白质基因中的某个碱基进行定向改变，从而改变蛋白质的氨基酸序列，使蛋白质的结构功能发生变化，产生符合人们所需的蛋白质或酶。

分子进化工程（molecular evolution engineering）是指在试管或实验室中模拟生物分子（如核酸、蛋白质和糖等分子）的进化，使长期的自然进化过程能在实验室中短期实现。酶分子进化工程是分子进化工程的一部分，是指酶基因通过随机的点突变与 DNA 序列的改组、重组和筛选等，使酶的稳定性、底物特异性、催化活性、耐热性等发生改变或甚至创造新酶的方法。

三、生物技术各构成成分之间的关系

生物技术中的五大工程（有时把蛋白质工程列入基因工程内，成为四大工程）之间是相互依赖、密切联系、难于分割的。在现代生物技术中基因工程是核心技术，但是基因工程包括蛋白质工程所提供的新的、具有特殊功能的细胞，还必须通过发酵工程或细胞工程来实现它的潜在的经济价值。酶工程中固定化酶和固定化细胞技术，它本来就是从发酵工程中分离出来的一部分，也是同发酵工程密不可分的技术。细胞工程中的动物和植物细胞大量培养技术原理类似于发酵工程，因此曾有人将动物和植物细胞大量培养技术归类于发酵工程。蛋白质工程是酶工程中酶分子修饰同基因工程相结合的产物，蛋白质工程获得的理想酶基因必须通过基因工程导入到宿主细胞中去，然后再通过发酵工程来实现其优良、特殊的催化功能。近年发展起来的分子进化工程中的酶分子进化又是酶工程和蛋白质工程的发展和延伸。由此看到，发酵工程和酶工程不仅本身是生物技术的重要组成部分，而且绝大多数生物技术目标都可通过发酵工程和酶工程来实现。因此，生物技术的主要应用领域，往往就是发酵工程和酶工程应用范围和研究或生产的对象。例如生物技术的一些新领域如环境工程、再生资源工程都是以发酵工程和酶工程作为基础和主要手段的。总之，现代生物技术的核心是基因工程，由它带动和推动其他各大工程的发展，而现代生物技术的基础和归宿则是发酵工程和酶工程，否则就不能获得产品和经济效益，也就体现不了基因工程和细胞工程的优越性。

第二节 生物技术的形成和发展

一、传统生物技术

生物技术的发展历史与食品发展的历史是密不可分的。传统生物技术应该说从史前时代起就一直为人们所开发和利用，并造福人类。最早的生物技术可以追溯到公元前 6000 年（距今约

8 000年)。在西方,苏美尔人和巴比伦人在公元前 6000 年就开始面包的发酵、酒精饮料、果汁发酵制醋和酿酒等。埃及人则在公元前 4000 年就开始制作面包。所以说生物技术是人类在劳动实践中最早发现和掌握的技术之一(表 1-1)。

表 1-1 生物技术的里程碑 (Byong H.Lee, 1996)*

传统生物技术 (old biotechnology)	
时 间	里 程 碑
公元前 6000	面包发酵、酒精饮料和来自发酵果汁的醋
公元前 2000	酿酒、饴糖制造
公元前 1400	啤酒、白酒以及醋的生产
公元前 1000	酱油
1100* *	预防天花疫苗
1200	酒精(从酒中蒸发)
1650	蘑菇的栽培
1680	列文虎克第一次发现了酵母细胞
1857—1876	巴斯德证明了微生物的发酵能力
1881	乳酸的微生物生产
1885—1900	乙醇、乙酸、甘油、丙酮、丙醇、柠檬酸的发酵生产,污水处理
1940	无菌技术的导入,抗生素(青霉素、链霉素、氯霉素)和生物活性物质(氨基酸、维生素、类黄酮、多糖)和疫苗的生产
1953	DNA 结构的发现
1957	谷氨酸的制造
1955—1960	深层发酵生产柠檬酸
现代生物技术 (new biotechnology)	
1969	千田一郎用固定化氨基酸酰化酶生产 L-氨基酸
1970—1972	细菌质粒 DNA 和大肠杆菌的转化
1973	打破遗传界限(限制性内切酶、连接酶)
1974	杂合基因在大肠杆菌中的表达
1975	杂交瘤(单克隆抗体)
1978	Somatostam(第一次重组 DNA 产物)
1982	重组人胰岛素
1983	杂合植物基因表达
1985	重组人生长激素
1986	重组乙肝疫苗、重组 α -干扰素
1987	重组组织溶纤酶原激活剂和重组色氨酸
1989	重组白细胞介素-2、重组 γ -干扰素
1989—1991	重组凝乳酶、重组 V _C 、抗细菌噬菌体的乳酸生产菌
1990	麦芽糖酶强化面包酵母
1992	脂肪酶、淀粉酶
1994	Flavr Savr 番茄、重组酿酒酵母

* 参照参考文献 [4]; * * 以下时间为公元纪年。

在石器时代后期，我国人民就会利用谷物造酒，这是最早的发酵技术。在公元前 221 年，周代后期，我国人民就能制作豆腐、酱和醋，并一直沿用至今。公元 10 世纪，我国就有了预防天花的活疫苗，到了明代，就广泛地接种疫苗以预防天花。16 世纪，我国的医生已知道被疯狗咬伤可传播狂犬病。

1680 年，荷兰人 Leeuwenhoek (1632—1723) 制成了能放大 170~300 倍的显微镜，并首先观察到了微生物——酵母。19 世纪 60 年代，法国科学家 L. Pasteur (1822—1895) 首先证实发酵是由微生物引起的，并建立了微生物的纯种培养技术，从而为发酵技术的发展提供了理论基础，使发酵技术纳入了科学的轨道。到了 20 世纪 20 年代，工业生产中开始采用大规模的纯种培养技术生产化工原料丙酮、丁醇。50 年代，在青霉素大规模发酵生产的带动下，发酵工业和酶制剂工业大量涌现。发酵技术和酶技术被广泛应用于医药、食品、化工、制革和农产品加工等部门。19 世纪初，遗传学的建立及其应用，产生了遗传育种学，并于 19 世纪 60 年代取得了辉煌的成就，被誉为“第一次绿色革命”，粮食产量大幅度增加，缓解了粮食问题。细胞学的理论被应用于生产而产生了细胞工程。在今天看来，上述诸方面发展，还只能被视为传统的生物技术。虽然它们还不具备高技术的诸要素，但为现代生物技术的发展奠定了基础。

二、现代生物技术的发展

现代生物技术是以 20 世纪 70 年代 DNA 重组技术的建立为标志的。1944 年 Avery 等阐明了 DNA 是遗传信息的携带者。1953 年 Watson 和 Crick 提出了 DNA 双螺旋结构模型，阐明了 DNA 的半保留复制，由此奠定了现代分子生物学的基础，开辟了分子生物学研究的新纪元，从而给生物学乃至整个人类社会带来了一场革命。由于一切生命活动都是由包括酶和非酶蛋白行使其功能的结果，所以遗传信息与蛋白质的关系就成了研究生命活动的关键问题。1961 年 M. Nirenberg 等破译了遗传密码，揭开 DNA 编码的遗传信息是如何传递给蛋白质这一秘密。基于上述基础理论的发展，1973 年，美国加利福尼亚大学旧金山分校的 Herber Boyer 和斯坦福大学的 Stanley Cohen 共同完成了一项著名的实验。他们选用了仅含有单一 EcoR I 位点的质粒载体 pSC₁₀₁，并用 EcoR I 将其切为线性分子，然后在 DNA 连接酶的作用下，将该线性分子与同样具有 EcoR I 黏性末端的另一质粒 DNA 片段连接，从而获得了具有两个复制起始位点的新的 DNA 组合。这是人类历史上首次有目的地进行了基因重组的尝试，标志着生物技术的核心技术——基因工程技术的开始。它向人们提供了一种全新的技术手段，使人们可以按照意愿在试管内切割 DNA、分离基因并经重组后导入其他生物或细胞，借以改造农作物或畜牧品种；也可以导入细菌这种简单的生物体，由细菌产生大量有用的蛋白质、生理活性物质等，或作为药物或作为疫苗；也可以直接导入人体内进行基因治疗。显然这是一项生物技术上的革命。

近年来，现代生物技术领域的研究和开发取得了飞速的发展，并对生命科学的其他领域产生了革命性的影响，这些领域包括植物学、动物学、微生物学、生物行为学、发育生物学、分子进化、遗传学等。同时以基因工程为核心，带动了现代发酵工程、现代酶工程、现代细胞工程、蛋白质工程以及分子进化工程的发展，形成了一门具有划时代意义和战略价值的现代生物技术，并

使它成为 21 世纪具有远大发展前景的新兴学科和产业。

三、现代生物技术的前景

近代科学的发展表明，每一次重大的科学发现和技术创新，都使人们对客观世界的认识产生一次飞跃；每一次技术革命浪潮的兴起，都使人们改造自然的能力和推动社会发展的力量提高到一个新的水平。现代生物技术的发展也不例外，它的发展促进了国民经济的发展和社会的进步，改善了人们的营养和健康水平，并将越来越深刻地影响世界经济、军事和社会的发展。现代生物技术作为 21 世纪高新技术的核心，对人类解决面临的食物、资源、健康、环境等重大问题将发挥越来越大的作用。大力发展生物技术及其产业已成为世界各国经济发展的战略重点。

现代生物技术在近 20 年的发展成就受到了各方面人士的普遍关注，更有许多专家将 21 世纪称为生物科学的世纪，将现代生物技术产业称为 21 世纪的朝阳产业。其原因一方面是由于现代生物技术发展迅速，在工业、农业、医药、环境等方面用途广泛，如可以改善农产品的数量和质量，解决粮食短缺问题，也可以提高人类生命质量，延长人类的寿命以及可以解决能源问题、减少环境污染；另一方面是由于现代生物技术具有其他技术所无法比拟的优越性，即可持续发展。面对人口膨胀、资源枯竭、环境污染等一系列直接关系到整个人类生死存亡的严重问题，人们越来越深刻地认识到发展具有可持续发展的新技术、新产业的必要性和紧迫性。由于生物技术是以生物（动物、植物、微生物、培养细胞等）为原料生产产品的，因此其原料具有再生性，同时利用生物系统生产产品产生的污染物很少，对环境的破坏性很小或几乎没有，微生物本身还可以消除环境中的污染物。鉴于生物技术产业的以上特点，清洁、经济的生物技术必然会在 21 世纪获得更大的发展。

（一）现代生物技术对人类生活的影响

医药生物技术和食品生物技术是生物技术领域中最活跃、产业发展最迅速、效果最显著的领域（表 1-2）。这是因为生物技术为探索提高人类营养、健康的因素和提高生活质量以及延长寿命提供了最有效的手段。目前，现代生物技术产品已走入寻常百姓家，生物技术成为提高全民日常生活质量的重要方法。例如，系统地对胎儿进行染色体检查，以确定胎儿是否携带有遗传缺陷基因，实现优生优育，提高人口质量（尽管对这种做法还有争论）；导入正常基因来治疗基因缺陷而引起的疾病；用单克隆抗体治疗和检测疾病；人类基因组计划探索人类的全部的遗传信息，以阐明生命的奥秘，人类的起源等；转基因植物逐步“走”上人们的餐桌，转入乙型肝炎抗体基因的水稻、转入胡萝卜素基因的水稻，为人们提供质量更高、营养成分搭配更合理的膳食和预防疾病的食品；基因工程药品胰岛素、干扰素、白细胞介素等已大批量生产，并投放市场；基因工程疫苗如病毒性肝炎疫苗、肠道传染病疫苗、寄生虫疫苗、流行性出血热疫苗等已经上市或已进入临床试验，安全、高效地预防疾病的发生和发展；PCR、Southern 杂交等方法也逐步广泛地用于多种疾病的分析诊断；利用酶工程技术的生物传感器的快速检测，寡聚糖的酶法生产，以及微生态制剂的发酵等都为人类的营养和健康起了重要的作用。

表 1-2 美国生物技术产品销售预测 (百万美元)

领域	1998 年	2003 年	2008 年	年增长率 %
人类疾病治疗	9 120	16 100	21 000	11
人类疾病诊断	2 100	3 100	4 300	7
农业	420	1 000	2 300	19
特制品	390	900	2 000	18
非医疗检验	270	400	600	8
合计	12 300	21 500	36 200	11

注：本表参照参考文献 [2]

综上所述，现代生物技术对人类生活的影响是多方面的，主要表现在：①更加准确地诊断、预防或治愈传染病和遗传疾病；②有效地提高作物的产量和质量，获得具有抗虫、抗真菌、抗病毒、抗逆境等优良形状的植物，或能产生药物和抗体等生理活性物质的转基因植物；③开发制造可以生产药物、生物高分子、氨基酸、酶类和各种食品添加剂的微生物；④创造带有更多优良性状的家畜和其他动物，或能产生药物和抗体等生理活性物质的转基因动物；⑤简化从环境中清除污染物和废弃物的程序；⑥生产营养丰富的食物，促进人类健康；⑦解决能源危机。因此，现代生物技术会使人类的生活更丰富，生活质量更高，寿命更长。

(二) 现代生物技术对经济社会发展及环境的影响

生物技术的发展可以增加农作物的产量，提高农作物的品质，解决食品的短缺。如转基因的农作物，由于导入了抗病虫、抗寒、抗除草剂或抗盐碱等基因，在减少农药的使用，减少病虫害的危害等而使产量增加的同时，不仅降低了成本，还减少对环境的污染。

生物技术的发展可以充分利用可再生资源，解决能源危机和治理环境污染。石油和煤炭是我们生活中的重要能源，然而地球上的这些化石资源是不能再生的，最终会枯竭。生物能源将是最有希望的新能源之一。植物纤维素资源是可以再生的资源，利用生物技术将植物纤维素及其副产品转化为乙醇，不仅可以生产新能源，还可以减少环境污染。利用分解蜡质的微生物还可提高石油的开采率。

虽然现代生物技术的发展已经给人类社会带来了巨大的社会效益和经济效益，促进了社会的发展，同时减少了现代化学工业和现代农业给生态环境带来的化学污染，另外也使资源的利用率更加提高。但是不可否认，生物技术在对人类有巨大贡献的同时，也会给人类社会带来了许多意想不到的不良影响，甚至可能会出现许多人们始料不及的后果。正如现代核物理学可以用来发电或作为能源造福人类，也可以用来制造原子弹屠杀人类一样，现代生物技术也是一柄双刃剑，它既可以造福人类，也可能用来制造致命的生物武器，危害人类，或被一些狂人用来制造克隆人，破坏整个人类社会的和平。因此，现代生物技术应用如果不加以控制，一些转基因的生物可能影响地球的生态环境，也有可能成为毁灭人类的凶手，这已经成为目前人们所共同关注的问题。

现代生物技术利用生物为原料生产产品，原料具有再生性，产生的污染很少，因此不会像化学合成一样对环境的破坏很大。但是，人们也关心生物技术对人类和自然环境的不良影响，例如：①经过基因工程改造的生物体是否会对其他的生物体或生态环境造成危害，或是否会影响人类的健康，即转基因生物的安全性；②使用和开发基因工程生物是否会降低自然界的遗传多样性，是否会影响整个地球的生态平衡；③人是否也可以成为基因工程操作的对象或克隆的对象；

④基因诊断的程序会不会侵犯个人隐私权；⑤那些经过基因工程改造过的生物体可不可以变成私人拥有的财产；⑥强调商业的成功是不是意味着现代生物技术的利益将只对富人有用而对穷人却用不起；⑦农业生物技术是否会彻底改变传统的耕作方式；⑧用现代生物技术生产的药物进行治疗是否会压抑同样有效的传统治疗方式；⑨现代生物技术专利的申请是否会阻止科学家之间自由的思想交流。

第三节 食品生物技术的基本特征和研究内容

一、食品生物技术的基本特征

从生物技术定义可以看出，生物技术是多学科交叉，涉及微生物学、生物化学、细胞生物学、分子生物学、生物物理学、免疫学、遗传学和化学工程等，同时，它也是应用性非常强的科学技术。因此现代生物技术又分支出若干个领域，如农业生物技术、医药生物技术、食品生物技术、海洋生物技术、环境生物技术、能源生物技术等等，涉及国民经济的所有领域。食品生物技术是生物技术的一个分支。传统生物技术的发展，从某种意义上说代表了食品生物技术的发展历史，因此，食品生物技术同生物技术的关系最为密切，现代食品生物技术是现代生物技术与食品科学技术相互渗透而形成的一门交叉学科。

食品生物技术（food biotechnology）是生物技术在食品原料生产、加工和制造中的应用的一个学科。它包括了食品发酵和酿造等最古老的生物技术加工过程，也包括了应用现代生物技术来改良食品原料的加工品质的基因、生产高质量的农产品、制造食品添加剂、植物和动物细胞的培养以及与食品加工和制造相关的其他生物技术，如酶工程、蛋白质工程和酶分子的进化工程等。

二、食品生物技术的研究内容

现代食品生物技术的发展很快，其主要研究内容可归纳于图 1-1：①通过基因工程和细胞工程改善食品原料农产品的品质和提高产量；②利用基因工程、发酵工程生产用于农产品保鲜的“绿色”抗氧化剂、防腐剂等；③通过基因工程、发酵工程、酶工程、蛋白质工程和分子进化工程使食品加工工艺高效化，提高食品的附加值，提高农产品的利用率，以及提高食品的保健功能；④利用基因工程、酶工程和发酵工程减少食品的损失、提高食品质量管理的效率和保证食品质量和安全性；⑤通过发酵工程和酶工程处理废弃物，提高资源的利用率并减少环境污染。

三、现代食品生物技术的作用

食品工业是国民经济的主要组成部分，它的发展不仅与人民生活密切相关，而且是衡量一个国家的经济、科学技术、精神文明和社会发展水平的重要指标。食品与人民的生活息息相关，食品生产必须满足人民生活水平不断提高的要求。尽管一些新技术、新工艺、新产品和新设备的开发和应用，使食品工业的产品种类、产量和质量都有了大幅度的提高，但现代生物技术的出现，

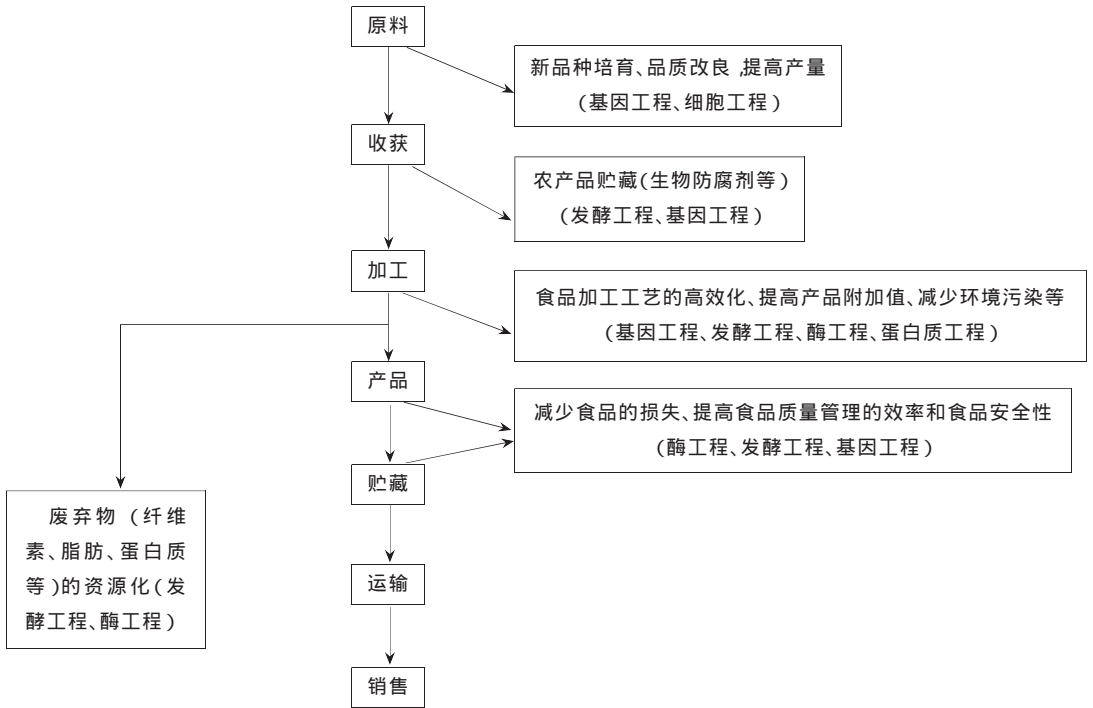


图 1-1 食品生物技术的研究内容和应用范围

又为改造传统的食品生产，进行食品深加工，开发新产品，提高食品质量和减少营养损失等增添了新的活力。

(一) 现代食品生物技术对人类健康和营养的影响

今天，全世界的人口已超过 60 亿，有人预言到 2050 年，全球人口将达到 90 亿，这些人口需要的农作物产量将是现在的 2.5~3 倍。用传统的栽培技术、育种技术等解决粮食问题的可能性很小。因此人们预测，广泛使用重组 DNA 技术（基因工程技术）将是解决未来粮食问题的最为有力的方法，因为它可以使农作物稳产、增产，耐盐碱、耐酸作物可以提高作物对不良土壤的耐受性，扩大可耕面积，从而增加产量。

基因工程技术的应用将提高全球人口的营养水平和健康水平，无论是发达国家，还是发展中国家均能从中得益。它可以提供质量更高、营养成分更丰富或具有保健功能的食物，满足不同人群的需求，解决人类，特别是贫困地区和国家人民的营养失衡问题。如利用重组 DNA 技术育成的含有 β -胡萝卜素的“黄金大米”，有助于克服维生素 A 缺乏引起的贫困儿童失明或死亡；把大豆中分离的能降低血清胆固醇和能积累铁的蛋白质的基因重组到水稻中的“降胆固醇大米”和“预防贫血大米”，将消除缺铁对孕妇和儿童的威胁；导入乙型肝炎病毒抗体基因的水稻，将大大减少乙型肝炎患者的数量；日本正在开发的降血糖水稻新品种，将为糖尿病患者提供具有疗效的主食。

重组 DNA 技术可提高新鲜水果、蔬菜的货架期，不仅使人们容易吃到新鲜、营养丰富的水

果、蔬菜，而且还可在一定程度上防止因水果蔬菜的腐烂引起的食物中毒。如第一个转基因植物——番茄 Flavr Savr，就大大延长了货架期，减少了损失。

益生菌是生长在人体内的有益于人类健康的微生物，主要是能在人体胃肠道内生长的乳酸菌类，经重组 DNA 技术改造后，将更加有利于人体的健康。

发酵工程技术会给人们提供有利于人类健康的、营养丰富的食品。如利用被孢霉和毛霉的 γ -亚麻酸和二十碳五烯酸（EPA）的发酵、利用海洋真菌和藻类的二十二碳六烯酸（DHA）和 EPA 的发酵，可提供预防和治疗动脉硬化、血栓形成和高血压等疾病的功能性食品成分。发酵大豆和发酵乳不仅提供足够的易消化的蛋白质，还可产生一些功能性成分，如枯草杆菌溶纤酶、血管紧张素转换酶抑制剂、功能性多肽等。食用菌的深层培养技术不仅生产预防和治疗癌症、提高免疫能力和降低高血压的功能性物质，还可开发新的食品资源。

许多食品添加剂大多是化学合成的，成本较低，但过多使用会影响人体健康。用发酵法则可避免这一问题，因此发酵法生产天然食品添加剂已经成为趋势。如发酵法生产维生素（ β -胡萝卜素，维生素 K₂、维生素 B₁₂、维生素 B₂）、色素（红曲色素、虾红素）、黏稠剂（黄原胶）、防腐剂（乳酸链球菌素）、酸味剂（醋酸、乳酸和柠檬酸）、香料（丁二酮）、氨基酸和新型甜味剂（赤藓醇）等。还有富硒酵母和富铁酵母的生产等。

植物细胞培养技术可生产人参皂甙、 β -胡萝卜素、螺旋藻细胞以及黄酮类、异黄酮、天然香料和天然色素等，不仅可预防疾病，改善营养条件，而且还可减少由化学添加剂残留对健康的影响。

酶在食品上的应用历史在某种程度上可以说同生物技术的发展历史一样，因为最初的生物技术就是在食品加工上利用了微生物的酶类的催化作用。酶工程技术在食品上的应用不仅使农产品的附加值增加、口感和风味更佳，同时使其易消化、营养价值提高和产生新的营养保健因子。

蛋白酶对高蛋白农产品如大豆、鱼、肉和乳等的水解，不仅为人们提供了大量易消化的氨基酸，还会形成功能性多肽。乳酪酶水解生成的酪蛋白磷酸肽能促进钙和铁的吸收从而有利于儿童的生长发育，改善骨质疏松、改善贫血等。大豆多肽容易消化吸收，适宜于制取婴幼儿和老人的营养食品，以及手术后病人的营养补充食品。牛乳、鱼、肉的酶水解多肽中具有能降低血压的血管紧张素转换酶抑制多肽，可预防高血压和脑血管疾病。

由 2~10 个单糖分子组成的低聚糖，如低聚异麦芽糖、低聚果糖、低聚半乳糖、低聚木糖等大多是由酶法合成的。这些低聚糖具有抑制肠道腐败细菌，促进有益菌生长的功能；降低低密度脂蛋白，有利于防止心脑血管疾病；以及提高人体免疫力的功能。

脂肪酶对油脂的改良，可提高油脂的营养价值，也可减少摄入过多脂肪对人们健康的影响。如结构脂（structured lipid）可以快速水解和快速利用，减少能量的积累；若在甘油上导入不饱和脂肪酸，还可提高免疫力，预防癌症和血栓等。

由固定化酶和细胞组成的生物传感器可以快速检测食品的安全卫生质量，保障人们的健康。

（二）现代食品生物技术对经济发展和环境的影响

现代食品生物技术可以满足人们尤其是发展中国家对粮食的需求，为人们提供足够的、经济的、安全的、高质量的食品以及传统技术无法获得的食物。同时，现代食品生物技术将会对社会发展和环境起重要的作用。

利用基因工程获得的牛生长激素注射于乳牛,可以提高牛乳的产量,而且不影响品质;猪生长激素可以降低猪的脂肪含量;大麻哈鱼生长激素可改善大麻哈鱼营养品质。

重组 DNA 技术可以改进作物的抗病性、抗虫性和耐除草剂性,因而可以减少农药的使用和残留,以及使农艺更简单。1999 年,美国种植了 35% 的抗虫和耐除草剂的玉米、45% 的抗虫棉花和 54% 的耐除草剂大豆。种植转基因的这些作物可以减少种植成本,而且可以增加产量。如耐除草剂大豆可以减少成本 3%~6%,而且可增加产量 13%~18%。植物转基因技术不仅使作物的产量提高,而且还使农药的残留减少和环境污染的降低。

发酵工程不仅增加农产品附加值,而且还可以用于废水处理。据统计,微生物发酵制作的食物约占所有食品总数的 1/3。通过现代生物技术改良微生物,会使发酵食品的产量和营养提高,口味改善,成本降低,效益提高。有机废水经适当的发酵处理,可达到排放要求,处理过程还可回收到单细胞蛋白或甲烷、酒精等。

酶技术在现代基因重组技术出现之前就是食品加工的重要手段,至今仍然是现代食品加工技术不可缺少的,而且在将来的农产品深加工方面显得越来越重要。据估计,2006 年美国食品加工中使用的酶的价值可达 2.14 亿美元。利用酶水解生产葡萄糖是 20 世纪 50 年代酶技术应用的重大成就,不仅减少了化学水解带来的环境污染,而且使葡萄糖的纯度提高、产量增加和成本降低。日本使用糖化酶生产葡萄糖后,葡萄糖的年产量猛增 10 倍。固定化葡萄糖异构酶技术的应用,使高果糖浆的产量增加和成本下降。通过 DNA 重组技术改良(蛋白质工程和酶定向进化工程)食品酶或增加食品酶的种类,对于食品加工将具有推动作用。重组凝乳酶(chymosin)的成功不仅使凝乳酶的产量得到了大幅度的提高,而且所合成的凝乳酶效果与牛胃中产生的凝乳酶完全相同。目前世界上已有十几个国家采用基因工程凝乳酶生产干酪。

近年来,资源的充分利用也成为全球可持续发展的重要因素。利用酶技术可使大量的废弃物成为有用的资源,并减少环境污染。如纤维素酶将农林业废弃物木质纤维素转化为葡萄糖,甚至乙醇;利用原果胶酶来提取苹果、柑橘饮料的废弃物中的果胶,变废为宝等。应用酶工程技术的生物传感器,可以精确、快速、灵敏地分析食品成分、检测病菌毒素和残留农药,保证食品质量和人类的健康。

但是,现代食品生物技术同时也存在着许多安全性的问题,特别是转基因的植物、动物和微生物的产品。

主要参考文献

- [1] 瞿礼嘉,顾红雅,胡莘,陈章良. 现代生物技术导论. 北京:高等教育出版社,1998
- [2] 宋思扬,楼士林. 生物技术概论. 北京:科学出版社,1999
- [3] Byong H. Lee. Fundamental of Food Biotechnology. 1996
- [4] Arnold F. H. & Volkov A. A. Current Opinion in Chemical Biology, 1999, 3: 54
- [5] 王岁楼. 食品生物技术. 北京:海洋出版社,1998
- [6] Biotechnology Report: Benefit. Food Technology, 2000, 54 (10): 62

- [7] UN 1999. The State of the World Population : A Time for Choices. United Nations , New York
- [8] 梁思宇, 陆兆新等. 微生物学通报, 2001, 5
- [9] 朱燕华, 构造脂质. 食品工业月刊 (台), 2000, 33 (3): 1
- [10] 谭静芬. 机能性寡糖介绍. 食品工业月刊 (台), 1999, 31 (7): 1
- [11] James C. Global Review of Commercialized Transgenic Crops , Intl. Service for the Acquisition of Agro-biotech Application. Ithaca NY , 1998

基因工程原理及其 在食品科学中的应用

第一节 基因工程基础

一、基因工程的定义、意义及研究内容

(一) 基因工程的定义

迄今为止，有关基因工程的定义颇多，表述不一。然而，就本质而言，它是指在分子水平上对基因进行操作的技术。因此一般认为，基因工程（gene engineering）是指运用限制性内切核酸酶、连接酶等酶类将不同 DNA 进行体外切割、连接构成重组 DNA，再将重组 DNA 经生物介导或直接导入等转移方法引入受体细胞进行克隆、表达，从而改变生物遗传性以创造生物新种质，或通过大量扩增为人类提供有用产品等的技术。

基因工程与遗传工程、重组 DNA 技术及分子克隆技术等相关但不相同。一般而言，遗传工程是指包括有性杂交、细胞融合、物理化学诱变、基因工程等在内的人工改造生物遗传性的全部技术；重组 DNA 技术（recombinant DNA technique）是指利用限制性内切核酸酶、连接酶等酶类将不同的 DNA 进行体外切割、连接构成新的 DNA 分子的技术；分子克隆技术（molecular cloning）是指将利用限制性内切核酸酶、连接酶等酶类将不同的 DNA 进行体外切割、连接构成的重组 DNA 引入宿主细胞进行复制扩增的技术。

(二) 基因工程的意义

基因工程是现代生物工程的主体核心技术。基因工程的最大特点是可打破生物种属界限，进行生物种（属、科、目、纲、门、界）内外基因的重组、遗传信息的转移。因此，它是人工定向改变生物遗传性的根本技术。

基因工程技术的建立和发展具有重大的理论意义和广泛的实践意义。在生物学基础研究领域，其从基因的结构与功能入手在分子水平上为细胞、组织、器官及个体的生长、发育、分化、进化等理论研究开辟了新途径；在医药学领域，它为采用基因疗法根治遗传性疾病及肿瘤等奠定了坚实的理论与技术基础，使传统技术难以或不能获得的许多珍贵药品得以大量生产从而实现商品化；在动植物生产、食品工业等领域，它已经得到了广泛的应用，并且还将发挥愈来愈大的作用。

(三) 基因工程的研究内容

根据一般技术操作流程，基因工程的研究内容主要包括以下几个方面：①运用合适的方法从生物体中分离或通过化学合成制备目的基因；②采用合适的方法将目的基因与合适的载体进行体

外连接, 构建重组 DNA; ③利用合适的方法将重组 DNA 导入受体生物细胞以获得转化体; ④采用合适的方法筛选出重组转化体阳性克隆; ⑤运用合适的方法对重组转化体阳性克隆进行进一步的分析以及操作, 使目的基因在受体生物细胞中高效表达。

二、基因工程的工具酶

如上所述, 基因工程的关键技术之一就是先将目的基因 DNA 从供体生物体中分离出来, 再与合适载体 DNA 连接重组等。这些分子操作涉及多种不同的酶。

基因工程的工具酶是基因工程中所用各种酶的统称。其种类繁多, 作用各异, 主要包括限制性内切核酸酶、DNA 甲基化酶、DNA 聚合酶、依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶、连接酶、激酶、磷酸酶和核酸酶等。

(一) 限制性内切核酸酶与 DNA 甲基化酶

1. 限制作用与修饰作用 许多细菌例如大肠杆菌等具有一种类似免疫的防卫系统, 即限制与修饰系统 (R-M 系统)。在限制与修饰系统中, 限制作用 (restriction) 是指一定类型的细菌可以通过其限制性内切核酸酶的作用, 切割降解入侵的外源 DNA (例如噬菌体 DNA), 使得外源 DNA 的入侵受到限制的现象; 修饰作用 (modification) 是指在 DNA 甲基化酶作用下, 生物体自身 DNA 分子在特定碱基的特定位置上发生甲基化而得到修饰, 从而免遭自身限制性内切核酸酶降解的现象。

2. 限制性内切核酸酶与 DNA 甲基化酶 如上所述, 限制与修饰系统的限制作用与修饰作用是分别借助限制性内切核酸酶与 DNA 甲基化酶来实现的。

限制性内切核酸酶 (restriction endonuclease), 简称限制酶, 是指一类能够识别和切割双链 DNA 分子内核苷酸序列的内切核酸酶。DNA 甲基化酶 (DNA methylase), 简称甲基化酶, 是指一类能够识别 DNA 特定序列, 并在其特定碱基的特定位置上引入甲基而发生修饰作用的酶。限制酶和甲基化酶主要是从多种微生物中分离纯化出来的。

为了能够区别不同的限制酶 (甲基化酶), 需要对其进行命名和分类。

(1) 限制酶 (甲基化酶) 的命名。其命名主要是参照 H. O. Smith 和 D. Nathans 提出的待命名酶的供体微生物的属名与种名相结合的原则进行的。

①以属名的第一个字母 (大写) 和种名的最前两个字母 (小写) 组成的三字母符号为其基本形式, 例如: 来源于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的酶用 Eco 表示; 来源于流感嗜血菌 (*Haemophilus influenzae*) 的用 Hin 表示。

②当同属不同种的两种微生物的种名前两个字母完全相同时, 则来自后一种微生物的酶的符号改用其种名词头前缀后第一个字母 (小写) 代替上述三字母符号中的最后一个字母, 例如: 来自 *Haemophilus parainfluenzae* (副流感嗜血杆菌) 的用 Hpa 表示, 而来自同一属的 *Haemophilus parahaemolyticus* (副溶血嗜血杆菌) 的则用 Hph 表示。

③当微生物具有特殊名称时, 则将代表该特殊名称的符号置于上述三字母符号之后, 例如: 来自 *Haemophilus influenzae* 的 Rd 株的用 Hind 表示; 来自 *Haemophilus influenzae* 的 Rf 型的用 Hinf 表示。

④当不止一种限制酶（甲基化酶）分离纯化自同一微生物株系时，则依其被分离的先后顺序以罗马数字（大写）置于上述命名符号之后，例如：来自 *Haemophilus aegyptius* 的三种酶分别用 Hae I、Hae II 和 Hae III 表示；来自 *Haemophilus influenzae* 的 Rd 株的三种酶分别用 Hind I、Hind II 和 Hind III 表示。

⑤为了区别起见，以在上述命名名称之前加 R. 表示限制酶类；以在上述命名名称之前加 M. 表示甲基化酶类。例如：来自 *Haemophilus influenzae* 的 Rd 株的第三种限制性内切核酸酶为 R.Hind III，其相应的 DNA 甲基化酶则为 M.Hind III。不过，当根据上下文得知所指的是限制酶时，一般前置的总称 R. 可略去，例如：Hind III 即表示来自 *Haemophilus influenzae* 的 Rd 株的第三种限制性内切核酸酶。

(2) 限制酶的分类。根据酶的性质，可将限制酶分为三个类型（表 2-1）。

表 2-1 限制性内切核酸酶的类型及其主要特性

主要特性	I 型	II 型	III 型
酶蛋白构成	三种不同的亚基	两个相同的亚基	两种不同的亚基
酶活辅助因子	ATP、Mg ²⁺ 、S-腺苷甲硫氨酸	Mg ²⁺	ATP、Mg ²⁺
识别序列特性	EcoB I : TGA ₈ TGCT EcoK I : AACN ₆ GTGC	旋转对称	EcoP I : AGACC EcoP ₁₅ I : CAGCAG
切割位点	距特异识别位点至少 1 000bp 处 随机切割	在特异识别位点上或其附近特 异切割	距特异识别位点 3' 端 24 ~ 26bp 处特异切割

① I 型：由三种不同亚基组成；辅助因子为 ATP、Mg²⁺ 及 S-腺苷甲硫氨酸；其切割位点距其识别位点至少 1 000 bp；且切割作用是随机的。因此，I 型限制酶不宜作为基因工程的工具酶，例如：EcoA I、EcoB I、EcoD I、EcoK I 等。

② II 型：由两个相同亚基组成；辅助因子仅为 Mg²⁺；其识别位点常具旋转对称性（图 2-1）；其切割位点与其识别位点重叠或在其附近；且切割作用特异性强。因此，II 型限制酶是基因工程理想的工具酶，例如：BamH I、EcoR I、EcoR V、Hind III、Not I、Sal I、Xba I。

③ III 型：由两种不同亚基组成；辅助因子为 ATP 和 Mg²⁺，也受 S-腺苷甲硫氨酸激活，但并非必需；其切割位点一般在距其识别位点 3' 端 24~26 bp 处。因此，III 型限制酶在基因工程中也不常用，例如：EcoP I、EcoP₁₅ I、Hinf III。

需要指出的是，I 型和 III 型限制性内切核酸酶均兼具限制酶活性和甲基化酶活性；而对 II 型限制性内切核酸酶而言，其只具限制酶活性，与其相应的 DNA 甲基化酶才具甲基化酶活性。II 型限制性内切核酸酶及其相应的 DNA 甲基化酶对 DNA 有相同的识别序列。

还要指出的是，限制性内切核酸酶没有种属特异性，即限制性内切核酸酶识别、切割特定序列的能力同底物 DNA 的来源无关，它可识别、切割各种来源的 DNA。但是，DNA 甲基化酶具有种属特异性，即某生物体的 DNA 甲基化酶只修饰保护自己的 DNA，而不修饰保护非己的 DNA。因此，某生物体的限制性内切核酸酶不能降解自身被修饰保护的 DNA，而只能降解外源的 DNA。

(3) II 型限制性内切核酸酶的基本特性。

①识别序列与切割位点：大多数Ⅱ型限制性内切核酸酶可识别长度为4~7bp的双链DNA特定序列，该识别序列（识别位点）常呈旋转对称性。少数Ⅱ型限制酶能识别更长的序列，例如：Bgl I能识别5'GCCNNNNNGGC3'（在识别序列以一条链表示时，按5'→3'的方向列出；“N”可为A、C、G或T）。还有一些Ⅱ型限制酶能识别多种核苷酸序列，例如：Hind II能识别4种核苷酸序列：5'CTPyPuAC3'（Py为C或T，Pu为A或G）；Taq II可识别两种截然不同的序列：GACCGA与CACCCA。

对于Ⅱ型限制性内切核酸酶而言，其切割位点一般与其识别序列一致。大多数Ⅱ型限制性内切核酸酶在其识别序列内切割DNA；而有些Ⅱ型限制酶则在距其识别序列附近一定长度的位置切割DNA，其具体切割位置“↓”用圆括号内的数字表示，例如Hga I：GACGC(5/10)，即表示其在如下位置切割：5'GACGCNNNNN↓3'和3'CTGCGNNNNNNNNNN↓5'。

②切割方式：根据双链DNA被切割所成的末端，一般可将切割方式分为三种：①在识别序列双链DNA两条链的对称轴上同时切断磷酸二酯键，形成双链平齐末端，例如Hae III，见图2-1(a)；②在识别序列双链DNA两条链的对称轴两侧同时从5'端切断磷酸二酯键，形成5'-磷酸端2~5个核苷酸突出单链黏性末端，例如EcoR I，见图2-1(b)；③在识别序列双链DNA两条链的对称轴两侧同时从3'端切断磷酸二酯键，形成3'-羟基端2~5个核苷酸突出单链黏性末端，例如Pst I，见图2-1(c)。

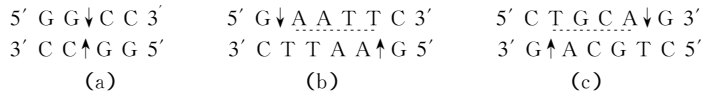


图2-1 Ⅱ型限制性内切核酸酶的旋转对称性及三种切割方式
(a) Hae III切割位点 (b) EcoR I切割位点 (c) Pst I切割位点

③同裂酶与同尾酶：在Ⅱ型限制性内切核酸酶中，来源不同而识别序列和切割方式均相同者称为同裂酶（isoschizomer），例如，Hpa II和Msp I两者的识别序列都是CCGG，切割方式也相同，因此二者为同裂酶。虽来源及识别序列不同，但DNA经其切割后能形成相同黏性末端者称为同尾酶（isocaudamer），例如：BamH I、Bcl I、Bgl II、Mbo I、Sau₃A I及Xho II切割DNA后都形成相同的GATC四核苷酸突出单链黏性末端，因此其为一组同尾酶。

需要指出的是，由同尾酶切割DNA所得到的黏性末端可以彼此连接起来，但是由此连接形成的重组DNA分子往往不能被原来同尾酶中的任何一种重新切开，即原来同尾酶的识别序列都已不再存在。例如，限制酶Sal I可以识别、切割G↓TCGAC，限制酶Xho I可以识别、切割C↓TCGAG，该两同尾酶的酶切片段可以彼此连接，但是其所形成的重组DNA片段GTCGAG或CTCGAC既不能被限制酶Sal I识别、切割，也不能被限制酶Xho I识别、切割。

④限制性片段长度与切割频率：经限制性内切核酸酶切割后产生的DNA片段称为限制性片段（restriction fragment）。一般不同限制酶切割DNA后所形成的限制性片段长度不一。

假设在某DNA分子中，A或T出现的频率为X，G或C出现的频率为Y，那么某限制酶在该DNA分子上的切割位点出现频率（切割频率或位点频率）F可用下式表示：

$$F = X^n Y^m$$

式中：n——该限制酶识别序列中双链A=T碱基对的数目；

m ——该限制酶识别序列中双链 G≡C 碱基对的数目。

如果构成某 DNA 分子的碱基对总数目 (B) 及某限制酶识别位点核苷酸序列均为已知, 那么该限制酶在该 DNA 分子上的理论切割位点数目 (N) 为:

$$N = BF$$

假定在某 DNA 分子中四种核苷酸残基数量相等, 那么识别序列为四个碱基对的限制酶在该 DNA 分子中切割位点出现频率为 $(1/4)^4$, 即 $1/256$, 也即平均 256 个碱基对出现 1 个切割位点。同样, 识别序列为六个碱基对的限制酶在该 DNA 分子中切割位点出现频率为 $(1/4)^6$, 即 $1/4096$, 也即平均 4096 个碱基对出现 1 个切割位点。

显然, 上述假设是以生物体 DNA 中核苷酸排列随机性为前提的。然而, 实际情况往往与上述理论值不尽符合。例如: 理论上, 40 kb 的 T₇ 噬菌体 DNA 上应各有 BamH I、EcoR I、Hind III (均属识别序列、切割位点为六个碱基对的限制酶) 的切割位点 10 个, 但实际上 1 个也没有。这是因为实际上 DNA 分子中限制酶的识别序列及切割位点的分布并不是随机的, 而是按照遗传学特性集中出现在结构基因的前后。例如: 在 36kb 的 pSa 因子中, 六个碱基对的识别序列及切割位点集中于其四个抗药性基因的 10kb 范围内, 而其余 26kb 的 DNA 片段与质粒复制和转录有关, 仅有几个六个碱基对的识别序列及切割位点。

此外, 真核生物 (特别是哺乳动物) DNA 含 GC 碱基对的数目相对较少, 因此, 一些限制酶 (例如: Hae II、Hha I、Hpa II) 在真核生物 DNA 分子中切割位点的出现频率远低于在原核生物 DNA 分子中切割位点的出现频率。

值得指出的是, 识别位点为四个碱基对的限制酶的切割位点实际出现频率与理论计算预测频率常较一致。

上述有些组的同尾酶中一些限制酶识别四核苷酸序列, 一些限制酶识别六核苷酸序列, 并且那些四核苷酸序列常包含于那些六核苷酸序列中。例如: Mbo I 和 Sau₃A I 均识别 GATC 四核苷酸序列, 而 BamH I 识别 GGATCC 六核苷酸序列。在基因工程中, 可以利用四核苷酸识别序列与六核苷酸识别序列在 DNA 分子上出现频率的不同, 选择合适的限制酶酶解 DNA, 获得大小合适的限制性片段, 插入合适的载体形成重组 DNA 分子, 导入适当受体细胞复制、表达。

(4) 影响限制性核酸内切酶活性的主要因素及优化策略。

①底物 DNA 制备物的纯度: 蛋白质、十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)、乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、酚、氯仿、乙醇及高浓度的盐离子等污染物都会抑制限制酶的活性。为了提高限制酶对底物 DNA 低纯度制备物的反应效率, 一般采用如下方法: ①增加限制酶的用量 (平均每 μg 底物 DNA 可用 10IU 甚至更多些); ②延长酶催化反应的保温时间, 使酶解更完全; ③扩大酶催化反应的体积, 使潜在的抑制因素被稀释, 以减弱其抑制作用; ④在反应液中加入适量亚精胺 (一般应用浓度为 $1\sim 2.5\text{ mmol/L}$), 以利限制酶对基因组 DNA 的酶解作用。但在 4°C 下, 亚精胺会使 DNA 沉淀, 因此, 必须将反应液于适当温度下保温数分钟后再将其加入。

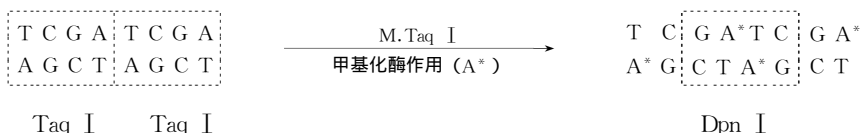
②底物 DNA 的甲基化程度: 大肠杆菌的绝大多数菌株含有两种 DNA 甲基化酶: ①dam 甲基化酶; ②dcm 甲基化酶。dam 甲基化酶特异地催化 DNA 分子中 5'GATC 3'序列中的腺嘌呤 N⁶ 位置的甲基化。与此序列相关的限制酶有 BamH I、Bcl I、Bgl II、Mbo I、Pvu I、Xho II

等，它们的识别序列内都含有 5'GATC 3'。此外，另一些限制酶的多个识别序列中有的含有此序列，例如，Cla I、Hph I、Mbo II、Taq I、Xba I 等的多个识别序列中有一个识别序列，即含 5'GATC 3'。因此，上述几种限制酶的活性会受到 dam 甲基化作用的强烈影响，只能部分酶解或完全不能酶解从正常大肠杆菌菌株中分离的底物 DNA。而 dcm 甲基化酶则催化 DNA 分子中 5'CCAGG 3'或 5'CCTGG 3'序列中的胞嘧啶 C⁵位置的甲基化。与此序列相关的限制酶有 EcoR II 等，其识别序列内含 5'CCAGG 3'和 5'CCTGG 3'。因此，EcoR II 等限制酶的活性会受到 dcm 甲基化作用的影响。

克服甲基化作用影响限制酶活性的方法如下：①用具有相同识别序列和切割位点，但不受甲基化作用影响的酶替代那些受影响而丧失作用的酶。例如，可用 Sau₃A I 替代 Mbo I 进行所需的酶解；②在没有相同功能的酶可以替代的情况下，或当需要在 Cla I、Hph I、Mbo II、Taq I、Xba I 等限制酶的每一个位点处切割原核 DNA 或用 Bcl I 完全酶解原核 DNA 时，必须从 dam⁻或 dcm⁻的大肠杆菌菌株中提取所需的底物 DNA；③利用 Ase I、Dra I、Mse I、Ssp I 等识别序列中不含胞嘧啶的限制酶切割胞嘧啶甲基化程度高的底物 DNA；④利用对某些位点特异性甲基化作用不敏感的限制酶对经某些甲基化修饰的底物 DNA 进行完全酶解。例如，在对甲基化程度很高的植物 DNA 进行某些分析时，可选用对^{m5}CG 和^{m5}CNG 不敏感的限制酶（^{m5}C 为 5-甲基胞嘧啶），例如，Bcl I、BstE II、BstN I、EcoR V、Hinc II、Hpa I、Kpn I、Mbo II、Nde I、Nde II、Rsa I、Spe I、Sph I、Taq I 等。

需要指出的是，在真核生物（例如哺乳动物）中，不会发生 DNA 分子中腺嘌呤 N⁶位置的甲基化。因此，受 dam 甲基化作用影响的那些限制酶均可有效地使用。

在基因工程中，可将限制酶不能切割甲基化核苷酸序列这一特性具体用于以下方面：①保护酶切位点。例如，在构建基因组 DNA 文库时，对于利用限制酶（例如 Alu I、Hae III）部分酶解基因组 DNA 所得到的 DNA 片段，先用 M. EcoR I 甲基化酶处理，使其内部 EcoR I 位点甲基化，后在其两端加上 EcoR I 接头。当用 EcoR I 酶解经这样处理过的 DNA 片段时，只有接头的 EcoR I 位点被切开，而 DNA 片段内部天然的 EcoR I 位点则受到保护，不被切开。②改变某些限制酶的切割特异性。例如，限制酶 Hind II 识别简并序列 GTPyPuAC。因此，它可特异识别和切割下列四种序列：GTCGAC、GTCAAC、GTTGAC 和 GTTAAC。而 M. Taq I 甲基化酶只能识别其中的一种序列，即 GTCGAC，使其腺嘌呤甲基化。这样，在用该甲基化酶处理后，含有这一序列的识别位点便不再被 Hind II 切割，从而使 Hind II 的切割特异性发生改变。③形成限制酶的新识别位点。某些腺嘌呤甲基化酶的使用形成了在 DNA 分子中原本不存在、而依赖于甲基化的限制酶（例如 Dpn I）现能识别的新位点。例如下列反应：



③底物 DNA 的结构构型：环状双螺旋 DNA 较线性 DNA 稳定。因此，在用限制酶酶解同样分子量的 DNA 时，环状双螺旋 DNA 所需酶量为线性 DNA 所需酶量的 10~20 倍。

需要指出的是，一些 DNA 分子中的一些特定酶切位点，只有在其他酶切位点被广泛切割的

条件下，才能被有关限制酶所酶切。

还有少数限制酶，例如 Sac II、Xma III 等，对不同部位酶切位点的酶切活性有很大差异，其中有些位点是很难被酶切的。

④酶反应缓冲液的组成：酶反应体系中常含 MgCl₂、NaCl 或 KCl、Tris (trishydroxymethyl aminomethane, 三羟甲基氨基甲烷)-HCl、β-巯基乙醇、二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT)、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 等。二价阳离子 (通常为 Mg²⁺) 是限制酶表现正常活性所绝对需要的。Tris-HCl 的作用在于使反应液的 pH 值稳定于酶活性所要求的最佳范围内。而后三者均有稳定酶的作用。

需要指出的是，一些限制酶对于 Na⁺ 或 K⁺ 离子浓度变化反应十分敏感；而另一些限制酶则可适应较广的离子强度变化幅度。

由于不同的限制酶对盐浓度要求不一，因此可将酶反应缓冲液配为高盐、中盐、低盐三类 (表 2-2)。需用中盐缓冲液的常用限制酶有 Ava I、BamH I、Bgl I、Bgl II、EcoR I、Hind III、Hpa I、Mbo I、Pst I、Sal I、Taq I 等；需用低盐缓冲液的常用限制酶有 Bel I、BstN I、Cla I、Hae III、Hpa II、Kpn I、Pvu II、Sma I 等。

表 2-2 不同限制酶反应所需低、中、高盐缓冲液及其组分

缓冲液	MgCl ₂ (mmol/L)	NaCl (mmol/L)	Tris-HCl (pH7.5) (mmol/L)	DTT (mmol/L)	BSA (μg/mL)
低盐	10	0	10	1	100
中盐	10	50	10	1	100
高盐	10	100	50	1	100

但是当需要进行双酶解或两种以上限制酶酶切时，如果这些限制酶可以在同种缓冲液中作用良好，那么可用这些限制酶同时酶切。如果这些限制酶所要求的缓冲液有所不同，那么可以依次采用如下方法进行酶切反应：①先用要求低盐缓冲液的限制酶酶解 DNA，然后补足适量的 NaCl，再用要求较高盐浓度缓冲液的限制酶进行酶解；②先用一种限制酶进行酶解，然后用乙醇沉淀酶解产物，再重悬于另一种缓冲液中进行第二次酶解；③使用所有限制酶均可表现活性的一种缓冲液，例如谷氨酸钾缓冲液 (potassium glutamate buffer, KGB)，将其适当稀释后即可达到各种限制酶表现最高活性所要求的缓冲液条件。

谷氨酸钾缓冲液的组成如下：2×KGB (谷氨酸钾) 200 mmol/L；Tris-乙酸 (pH 7.5) 50 mmol/L；乙酸镁 20 mmol/L；β-巯基乙醇 1 mmol/L；牛血清白蛋白 (组分 V) 100 μg/mL。

因为蛋白质在稀释液中会迅速变性，所以务必不要在蛋白质浓度低于 0.1 mg/mL 的反应液中使用酶。而牛血清白蛋白 (组分 V) 是一种很好的可加入酶反应液中的中性蛋白质，它的使用终浓度为 0.1 mg/mL。

⑤酶反应的最适温度：大多数限制酶反应的最适温度为 37℃，少数限制酶反应的最适温度高于或低于此温度。例如：Sma I 为 25℃；Apa I 为 30℃；Taq I 为 65℃。反应温度高于或低于其最适温度，酶的活力均会下降。因此，应根据各限制酶反应的最适温度作相应调整。

(5) 限制性内切核酸酶酶解反应的操作步骤及注意要点。以下是对 0.2~1.0 μg DNA 进行限制性内切核酸酶酶解的典型反应步骤。如果要对大量的 DNA 进行酶解，那么反应的各种成

分均须相应放大。

①将提纯制备的 DNA 溶液加入一灭过菌的微量离心管中，并与适量无菌水混匀，使总体积为 $18 \mu\text{L}$ 。

②加入 $2 \mu\text{L}$ 合适的 $10 \times$ 限制酶酶解缓冲液（对溶液体积作相应调整后，也可使用 $2 \times$ KGB）。轻弹离心管外壁以混匀之。

③加入 $1 \sim 2$ IU 所选限制酶，再轻弹离心管外壁以混匀之。

④将上述混匀的反应液置于适当温度温育适当时间。

⑤加入 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 使终浓度达 10 mmol/L ，以终止反应。

⑥如果酶解后立即对 DNA 直接进行凝胶电泳分析，那么可加入 $6 \mu\text{L}$ 凝胶电泳加样缓冲液。振荡混匀后，即可加样进行电泳。

⑦如果 DNA 酶解反应液体积过大以至加样孔装不下，那么可按以下方法对反应液进行浓缩：在用 EDTA 终止反应后，加入 0.6 体积的 5 mol/L 乙酸铵和 2 体积的乙醇，在冰上放置 5min；然后于 4°C 离心 ($12\,000 \text{ g}$, 5min)，倾去含大量蛋白质的上清液；将于室温下晾干的 DNA 沉淀溶于适量 pH 7.6 的 TE (Tris-EDTA) 中。

⑧如果需对酶解后的 DNA 作进一步纯化，那么可用酚 + 氯仿和氯仿各抽提一次，再用乙醇沉淀 DNA。

DNA 样品经限制酶酶解后，在进一步处理前往往需要钝化限制酶活性，终止反应。钝化大多数限制酶活性，终止反应的常用方法如下：①在 65°C 条件下温浴 5min；②对于有些耐热酶，例如 BamH I、Hae II 等，则需加入终止反应的试剂，例如加入 0.5 mol/L 的 EDTA，使之在溶液中的终浓度达到 10 mmol/L ，以螯合 Mg^{2+} ，终止反应；③用脲、SDS 及胍等变性剂使限制酶失活。

(二) DNA 聚合酶

在基因工程中，许多技术都涉及在 DNA 聚合酶催化下的 DNA 体外合成反应。DNA 聚合酶作用时一般都需要模板。大多数聚合酶优先选用 DNA 模板，虽也可以 RNA 为模板，不过后者一般效率较低。最常用的依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶有大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (全酶)、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 大片段 (Klenow 片段)、 T_4 噬菌体编码的 DNA 聚合酶、耐热的 DNA 聚合酶 (Taq DNA 聚合酶) 等。而依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶，即逆转录酶，优先以 RNA 为模板，也可以 DNA 为模板，因此该聚合酶能以 RNA 为模板催化合成双链 DNA。还有一种 DNA 聚合酶，它不以 DNA 或 RNA 为模板，而只是将核苷酸加到已有 DNA 分子的末端。因此，该种 DNA 聚合酶也称末端脱氧核苷酸转移酶 (简称末端转移酶)。

1. 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (全酶) 该酶为一种从大肠杆菌中分离出的一条分子量为 109×10^3 的多肽链 (球蛋白)。

它主要具有三种活性：① $5' \rightarrow 3'$ DNA 聚合酶活性，以单链 DNA 为模板，以带 $3'$ 自由羟基的 DNA 片段为引物；② $5' \rightarrow 3'$ 外切核酸酶活性，从 $5'$ 端既降解双链 DNA，也降解 RNA-DNA 杂交体中的 RNA 链 (RNA 酶 H 活性)；③ $3' \rightarrow 5'$ 外切核酸酶活性，底物为带 $3'$ 自由羟基的双链 DNA 或单链 DNA。

需要指出的是，对双链 DNA 的外切核酸酶活性可被 $5' \rightarrow 3'$ DNA 聚合酶活性所封闭，也可被

高浓度的 dNTP 所抑制。

该酶主要用于以下方面：①以切刻平移法 (nick translation) 标记 DNA。在所有聚合酶中，只有该酶能用于此反应，因为只有其具有 5'→3' 外切核酸酶活性。②对 DNA 分子的 3' 突出尾进行末端标记。但是如果要用这类反应进行末端标记，那么应首选 T₄ 噬菌体 DNA 聚合酶，因为其具更强的 3'→5' 外切核酸酶活性。

2. 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 大片段 (Klenow 片段) 该酶为一条分子量为 76×10^3 的多肽链，一般由大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 全酶经枯草杆菌蛋白酶酶解获得，也可通过克隆技术获得。

该酶主要具有两种活性：①5'→3' DNA 聚合酶活性，以单链 DNA 为模板，以带 3' 自由羟基的 DNA 片段为引物；②3'→5' 外切核酸酶活性，底物为带 3' 自由羟基的双链 DNA 或单链 DNA。

需要指出的是，对双链 DNA 的外切核酸酶活性可被 5'→3' DNA 聚合酶活性所封闭，也可被高浓度的 dNTP 所抑制。

该酶主要用于以下方面：①补平限制酶切割双链 DNA 所产生的 3' 凹端；②如果以标记的 dNTP 补平双链 DNA 的 3' 凹端，那么可对 DNA 分子进行末端标记；③对 DNA 分子的 3' 突出尾进行末端标记；④在 cDNA 克隆中，合成 cDNA 第二链；⑤应用 Sanger 双脱氧链末端终止法进行 DNA 测序。

需要指出的是，大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 大片段 (Klenow 片段) 在所有限制酶缓冲液中均能良好地发挥作用。

3. T₄ 噬菌体 DNA 聚合酶 该酶来源于 T₄ 噬菌体感染的大肠杆菌，分子量为 114×10^3 。

该酶主要具有两种活性：①5'→3' DNA 聚合酶活性，以单链 DNA 为模板，以带 3' 自由羟基的 DNA 片段为引物；②3'→5' 外切核酸酶活性，底物为带 3' 自由羟基的双链 DNA 或单链 DNA。

需要指出的是，对双链 DNA 的外切核酸酶活性可被 5'→3' DNA 聚合酶活性所封闭，也可被高浓度的 dNTP 所抑制。其 3'→5' 外切核酸酶活性比 Klenow 片段强 200 倍，且对单链 DNA 的作用比对双链 DNA 的作用强得多。

该酶主要用于以下方面：①补平限制酶切割双链 DNA 产生的 3' 凹端。②如果以标记的 dNTP 补平双链 DNA 的 3' 凹端，那么可对 DNA 分子进行末端标记。不过，补平及标记反应必须要在高浓度 dNTP 存在下进行，以使该酶催化的聚合反应压倒其强烈的 3'→5' 外切核酸反应。③对 DNA 分子的 3' 突出尾进行末端标记，并且该酶为利用此法进行此类末端标记的首选酶。④将双链 DNA 的突出端转化成平齐端。在制备与合成接头连接的双链 DNA 时，经常利用这一特性。在高浓度 dNTP 存在下，带有混合的 5' 及 3' 突出末端的 DNA 分子可由该酶催化转化成平齐末端的 DNA 分子。

4. Taq DNA 聚合酶 该酶最初来源于水生栖热菌 (*Thermus aquaticus*)，现可由基因工程途径来生产。该酶的分子量为 65×10^3 ，是一种非常耐热的依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶。

该酶主要具有一种活性，即 5'→3' DNA 聚合酶活性，以单链 DNA 为模板，以带 3' 自由羟基的 DNA 片段为引物。

该酶主要用于以下方面：①对 DNA 进行测序；②通过聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 对 DNA 分子的特定序列进行体外扩增。

需要指出的是，该酶在作用时需要 Mg^{2+} ，同时引物-模板杂交体的变性和复性温度均受

二价阳离子的影响，因此必须确定每次扩增反应的最佳 Mg^{2+} 浓度。

还要指出的是，磷酸盐缓冲液抑制该酶的活性，故务必避免使用磷酸盐缓冲液。该酶扩增反应通常在 Tris 缓冲液中进行，该缓冲液在室温时 pH 为 8.3。

5. 逆转录酶（依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶）常用的逆转录酶有两种：一种来自禽成髓细胞瘤病毒（AMV），由两条多肽链组成，分子量为 170×10^3 ；一种来自能表达克隆化的 Moloney 鼠白血病病毒（Mo-MLV）逆转录酶基因的大肠杆菌，由单链多肽组成，分子量为 84×10^3 。

该类酶主要具有两种活性：① $5' \rightarrow 3'$ DNA 聚合酶活性，以 RNA 或者 DNA 为模板，以带 $3'$ 自由羟基的 RNA 或 DNA 片段为引物；② RNA 酶 H 活性，即 $5' \rightarrow 3'$ 及 $3' \rightarrow 5'$ 外切核糖核酸酶活性，特异地降解 RNA-DNA 杂交体中的 RNA。

需要指出的是：禽源逆转录酶具有很强的 RNA 酶 H 活性；而鼠源逆转录酶则具相对较弱的 RNA 酶 H 活性。因此，禽源逆转录酶中高水平的 RNA 酶 H 活性往往趋向于抑制 cDNA 的产量并限制 cDNA 合成的长度。

还要指出的是：禽源逆转录酶在 42°C （鸡的正常体温）能有效发挥作用；而鼠源逆转录酶在此温度时则迅速失活。禽源逆转录酶能更有效地拷贝较复杂的 mRNA。禽源逆转录酶在 pH 8.3 时的活性要比在 pH 7.6 时更高，而后一种 pH 则更有利于鼠源逆转录酶催化反应。当反应的 pH 离开最佳 pH 仅差 0.2 时，这两种酶催化合成的 cDNA 长度就将大大缩短。由于 Tris 缓冲液的 pH 会随温度发生变化，因此必须检测在选定温度下反应体系的 pH。

该类酶主要用于以下方面：①将 mRNA 转录成双链 cDNA。在单链 DNA 或 RNA 模板参与下，其也可用于制备杂交探针。②标记带 $5'$ 突出端的 DNA 片段（补平反应）。③当大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段或测序酶等使用结果不理想时，它可用于双脱氧链终止法测定 DNA 序列。

需要指出的是，因为逆转录酶无 $3' \rightarrow 5'$ 外切核酸酶活性，即无校对功能，所以其催化的聚合反应容易出错。在高浓度 dNTP 和 Mn^{2+} 存在下，大约每 500 个碱基会出现一个碱基的错误掺入。另一方面，逆转录酶要求反应中的 dNTP 的 K_m 值非常高（在 mmol/L 范围内）。为了防止合成 DNA 反应的提前终止，必须在反应体系中加入高浓度的 dNTP。

还要指出的是，以单链 DNA 为模板，以寡核苷酸作引物，逆转录酶亦可沿 $5' \rightarrow 3'$ 方向合成 DNA 单链。以 RNA 为模板合成的 cDNA 既可以是单链亦可以是双链。但是，以自身序列为引物进行合成时的效率远不如以外加的寡核苷酸为引物进行合成时的效率高。因此，自身互补的发夹型 cDNA 双链分子在所合成的双链 cDNA 总量中所占比例往往很小。在反应体系中加入终浓度为 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的放线菌素 D 可抑制 DNA 第二链的合成。

6. 末端脱氧核苷酸转移酶（末端转移酶）该酶来源于小牛胸腺，分子量为 60×10^3 ，是一种不需要模板的特殊的 DNA 聚合酶。

该酶主要具有一种活性，即末端转移酶活性，在二价阳离子存在下，其催化 dNTP 加于 DNA 分子的 $3'$ 羟基端。如果加入的核苷酸为嘧啶核苷酸，那么 Co^{2+} 为首选阳离子；如果加入的核苷酸为嘌呤核苷酸，那么 Mg^{2+} 为首选阳离子。

需要指出的是，该酶作用的受体 DNA 可短至 3 个核苷酸。如果受体 DNA 与反应体系中核苷酸的比例适当，那么在受体 DNA 的 $3'$ 末端可掺入数千个核苷酸。如果作为底物的核苷酸经过

修饰(例如, ddNTP 或 3'-脱氧腺苷三磷酸), 那么可在受体 DNA 的 3'末端仅加上一个核苷酸。该酶强烈偏向于以带 3'突出端的双链 DNA 或带 3'羟基端单链 DNA 作为受体 DNA; 也能在含 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 的低离子强度缓冲液中以带 3'平端或 3'凹端的 DNA 作为受体 DNA, 但效率相对较低。

该酶主要用于以下方面: ①给载体 DNA 或 cDNA 加上互补的同聚尾; ②以 ^{32}P 标记的一种 dNTP、一种 ddNTP 或一种 rNTP 来标记 DNA 片段的 3'端。

(三) 依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶

1. SP_6 噬菌体 RNA 聚合酶 该酶来源于 SP_6 噬菌体感染的鼠伤寒沙门氏菌 LT_2 株。

该酶主要具有一种活性, 即 5'→3'RNA 聚合酶活性, 识别双链 DNA 模板上相应的噬菌体特异性启动子, 并且以此双链 DNA 为模板合成 RNA。

该酶主要用于以下方面: ①合成单链 RNA, 制备杂交探针; ②合成单链 RNA 作为体外翻译系统中的功能性 mRNA 或体外剪接反应的底物。

需要指出的是, 该酶对其相应的启动子具有高度特异性。由于该酶可以在体外合成大量与外源 DNA 单链互补的 RNA, 因此可以通过在一些专门设计的载体中改变外源 DNA 上游的该酶相应启动子的方向, 合成与外源双链 DNA 模板的任一条链互补的 RNA。

2. T_7 或 T_3 噬菌体 RNA 聚合酶 该类酶来源于 T_7 或 T_3 噬菌体感染的大肠杆菌。

该类酶主要具有一种活性, 即 5'→3'RNA 聚合酶活性, 识别双链 DNA 模板上相应的噬菌体特异性的启动子, 并以此双链 DNA 为模板合成 RNA。

该类酶主要用于以下方面: ①合成单链 RNA, 制备杂交探针; ②合成单链 RNA 作为体外翻译系统中的功能性 mRNA 或体外剪接反应的底物; ③利用带有 T_7 噬菌体启动子的载体在大肠杆菌和酵母中表达克隆化基因。

需要指出的是, 该类酶对其相应的启动子也都具有高度特异性。由于该类酶可以在体外合成大量与外源 DNA 单链互补的 RNA, 因此可以通过在一些专门设计的载体中改变外源 DNA 上游的该类酶相应启动子的方向, 合成与外源双链 DNA 模板的任一条链互补的 RNA。

(四) 连接酶、激酶及磷酸酶

DNA 连接酶 (DNA ligase) 是指将两段 DNA 拼接起来的酶类。在基因工程中, 最常见的 DNA 连接酶为 T_4 噬菌体 DNA 连接酶。

RNA 连接酶 (RNA ligase) 能使含 5'磷酸基端及 3'羟基端的单链 RNA (或 DNA) 共价连接起来。该酶主要用于对 RNA 进行 3'末端标记, 即将 ^{32}P 标记的 3', 5'-二磷酸单核苷 (pNp) 加到 RNA 的 3'羟基端。

1. T_4 噬菌体 DNA 连接酶 该酶来源于 T_4 噬菌体感染的大肠杆菌, 分子量为 68×10^3 。

该酶主要具有一种活性, 即催化 DNA 的 5'磷酸基与 3'羟基之间形成磷酸二酯键。该酶的核酸底物为黏性末端 DNA、平齐末端 DNA、带切刻的 DNA 等。

该酶主要用于以下方面: ①连接带匹配黏性末端的 DNA 分子。由于聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 可增强水溶液中分子间的有效作用, 因而此类试剂在低浓度下可促进 DNA 分子间的连接。②使平齐末端的双链 DNA 分子互相连接或与合成接头相连接。这类反应要比黏性末端连接慢得多。不过, 单价阳离子 (例如: NaCl , $150 \sim 200 \text{ mmol/L}$) 及低浓度的 PEG 可以大

大增加高浓度的带 5' 磷酸基与 3' 羟基的平齐末端的连接速率。

需要指出的是, 该酶不受 dNTP 抑制。该酶在所有限制酶缓冲液中均能较好地发挥作用。虽然该酶可作用于带切刻的 DNA 底物, 也可作用于 RNA 底物, 但是其效率要低得多。

还要指出的是, 在连接前, 如果 DNA 缺乏所需的磷酸基团, 那么可用 T_4 噬菌体多核苷酸激酶处理, 使 DNA 磷酸化。相反, 用磷酸酶除去 5' 磷酸基团后, DNA 便不再能连接起来。

2. T_4 噬菌体多核苷酸激酶 该酶来源于 T_4 噬菌体感染的大肠杆菌。

该酶主要具有如下活性: ①激酶磷酸化活性, 催化 ATP 的 γ -磷酸基转移至 DNA 或 RNA 的 5' 末端。其常用于以下两种反应: 一是在正向反应中, ATP 的 γ -磷酸基被转移至去磷酸化的 DNA 的 5' 端; 二是在交换反应中, 过量的 ATP 可使该酶将磷酸化 DNA 的 5' 端磷酸转移至 ADP, 然后 DNA 从 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 中获得放射性标记的 γ -磷酸基而重新磷酸化。②3' 磷酸酶活性, 该酶的核酸底物为双链 DNA、单链 RNA 或 DNA、DNA 切刻或缺口、寡核苷酸等。

该酶主要用于以下方面: ①标记 DNA 的 5' 端, 以供 Maxam-Gilbert 法测序、 S_1 核酸酶分析以及其他必须使用末端标记 DNA 操作之需; ②对准备用于连接但缺乏 5' 磷酸的 DNA 或合成接头进行磷酸化。

需要指出的是, 亚精胺能促进 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 的掺入, 并且可抑制存在于某些 T_4 噬菌体多核苷酸激酶制剂中的核酸酶。

还要指出的是, 去磷酸化后的 DNA 必须用凝酸电泳、密度梯度离心或 Sepharose CL-4B 柱层析等进行严格的纯化以除去低分子量的核酸。否则, 这些低分子量核酸可提供大量 5' 末端, 而成为 T_4 噬菌体多核苷酸激酶催化 DNA 标记反应的主要底物。

需要注意的是, 由于铵离子是该酶的强烈抑制剂, 因此用此酶处理前, DNA 不要溶于含铵离子的溶液或从含铵盐的缓冲液中沉淀出来。此外, 即使低浓度的磷酸也会抑制该酶的活性, 因此交换反应的首选缓冲液是咪唑缓冲液 (pH 6.4); 而 Tris 缓冲液则是正向反应的首选缓冲液。

3. 碱性磷酸酶 该酶来源于大肠杆菌及牛小肠。

此两种来源的碱性磷酸酶, 即细菌碱性磷酸酶 (bacterial alkaline phosphatase, BAP) 和牛小肠碱性磷酸酶 (calf intestinal alkaline phosphatase, CIP) 均具磷酸酶活性, 催化去除 5' 磷酸的反应。该酶的底物为单链或双链 DNA 及 RNA、rNTP 和 dNTP。

该酶主要用于以下方面: ①在用 ^{32}P 标记 5' 末端前, 去除 DNA 或 RNA 分子的 5' 磷酸; ②去除 DNA 片段 5' 磷酸, 以防自身环化。

(五) 核酸酶

1. BAL_{31} 核酸酶 该酶来源于埃氏交替单胞菌 (*Alteromonas espejiana*) BAL_{31} 。

该酶主要具有如下活性: ①3' 外切核酸酶活性, 从线性 DNA 两条链的 3' 端去除单核苷酸; ②内切核酸酶活性, 从内部切割 DNA 的单链区; ③RNA 酶活性, 酶解 RNA, 不过活性很低。该酶的底物为双链 DNA、带切刻的双链 DNA、带 3' 羟基端的单链 DNA 及双链 RNA 分子等。

需要指出的是, 该酶从末端降解 DNA 的作用相对比较均匀。该酶降解 DNA 绝对依赖于 Ca^{2+} 的存在。因此, 可以在反应的不同阶段加入螯合剂 EGTA [ethylene glycol bis (2-amino ethylether) tetraacetic acid, 乙二醇双 (2-氨基乙醚) 四乙酸] 而使反应终止。

该酶主要用于以下方面: ①通过可控方式去除双链 DNA 的末端核苷酸。缩短后的 DNA 分

子具有多种用途，例如：产生缺失；对启动子或其他调控序列附近的的目的序列进行分析等。②对 DNA 进行限制酶切作图。③在制备重组 RNA 时，从双链 RNA 上去除核苷酸。

还要指出的是，在连接 BAL₃₁ 的酶解产物时，必须考虑到该酶 3' 外切核酸酶活性大约为其单链特异性内切酶活性的 20 倍。因此，通过切割线状双链 DNA 所产生的单链尾区的平均长度取决于该酶的使用浓度。当酶使用浓度为 2~5 IU/mL 时，平均每个末端可保留 5 个核苷酸的单链 DNA，大约 10%~20% 的分子不经进一步处理即可与平端 DNA 相连接；而当酶使用浓度为 0.1~0.2 IU/mL 时，单链末端可能很长，平端连接的效率就很低。然而，无论所用 BAL₃₁ 浓度高低，都必须用 T₄ 噬菌体 DNA 聚合酶或大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段对其酶解产物进行修补，以利平端连接。

2. S₁ 核酸酶 该酶来源于米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)。

该酶主要具有一种活性，即单链特异性核酸酶活性：特异降解单链 DNA 或 RNA，产物为带 5' 磷酸的单核苷酸或寡核苷酸。而双链 DNA、双链 RNA、DNA-RNA 杂交体对此酶相对不敏感。不过，如果所用 S₁ 核酸酶的量很大，那么双链核酸亦可被完全酶解；如果所用 S₁ 核酸酶的量中等，那么可在切刻或小缺口处切割双链核酸。

该酶主要用于以下方面：①分析 DNA-RNA 杂交体的结构。例如，S₁ 核酸酶保护分析法 (nuclease S₁ protection assay) 是一种检测 RNA 的杂交技术。将单链 DNA 探针与待测 RNA 样品在液相中进行杂交，形成 DNA-RNA 杂交双链。该酶能特异降解未形成杂交双链的 DNA 单链和 RNA 单链，而 DNA-RNA 杂交双链则受到保护而不被降解。该法灵敏度比 Northern 杂交法更高，并可进行较为准确的定量。如果选择适当的探针，还可进行基因转录起始位点分析及内含子剪切位点分析等。②去除双链 DNA 片段中突出的单链尾，产生平齐末端。③酶解双链 cDNA 合成中产生的发夹环。

需要指出的是，该酶在低 pH 环境下才能发生作用；其对单链 DNA 的活性比对单链 RNA 的活性更强。

3. 核糖核酸酶 A (RNA 酶 A) 该酶来源于牛胰脏。该酶主要具有一种活性，即内切核糖核酸酶活性，特异地作用于 RNA 分子上嘧啶残基 (C 和 U) 的 3' 端，切割其与相邻核苷酸形成的磷酸二酯键。在低盐浓度下，其可切割单链、双链 RNA 及 DNA-RNA 杂交体中的 RNA。

需要指出的是，在没有辅助因子及二价阳离子存在时，该酶的作用可被胎盘 RNA 酶抑制剂或钒钒-核糖核苷复合物所抑制。但在一般情况下，该酶反应条件很广，而且极难失活。需用蛋白酶 K 处理，再用酚反复抽提以去除之。

该酶主要用于以下方面：①从 DNA-RNA 杂交体和 RNA-RNA 杂交体中去除未杂交的 RNA 区。例如，RNA 酶保护分析法 (RNase protection assay) 是一种检测 RNA 的杂交技术，该法的基本原理与 S₁ 核酸酶保护分析法的基本原理相同，只是该法所采用的探针为单链 RNA 探针，杂交后形成 RNA-RNA 双链。该酶专一地降解单链 RNA，而双链 RNA 则受到保护。该法的灵敏度比 S₁ 核酸酶保护分析法还要高数倍。②确定 DNA 或 RNA 中单碱基突变的位置。RNA-DNA 杂交体或 RNA-RNA 杂交体中的单碱基错配可被该酶识别并切割。

4. 核糖核酸酶 H (RNA 酶 H) 该酶来源于大肠杆菌。

该酶主要具有一种活性，即内切核糖核酸酶活性，特异地水解 DNA-RNA 杂交体中 RNA 的

磷酸二酯键，但不降解单链或双链的 DNA 或 RNA。

该酶主要用于以下方面：①特异地降解 cDNA 第一链合成时产生的 RNA-DNA 双链中的 mRNA 分子，以利双链 cDNA 的合成；②通过合成 DNA 及与 RNA 形成局部的 RNA-DNA 杂交体，诱发该酶催化特异性的 RNA 降解。

5. 脱氧核糖核酸酶 I (DNA 酶 I) 该酶来源于牛胰脏。

该酶主要具有一种活性，即内切核酸酶活性，优先从嘧啶核苷酸处水解双链 DNA 或单链 DNA。在 Mg^{2+} 存在下，该酶可独立作用于双链 DNA 的每一条链，且切割位点呈随机分布；在 Mn^{2+} 存在下，该酶可在双链 DNA 两条链的大致相同位置切割，产生平齐末端 DNA 片段或只带 1~2 个核苷酸单链突出的 DNA 片段。

该酶主要用于以下方面：①在以切刻平移法进行 DNA 标记时，可用该酶在双链 DNA 上产生随机切刻；②建立随机克隆，以便利用 M_{13} 噬菌体载体进行测序；③分析蛋白质-DNA 复合物 (DNA 酶足迹法)。

三、基因工程的载体

基因工程的重要环节就是将外源基因导入受体生物细胞，并且使它得到复制、表达。然而，单独外源 DNA 片段是很难进入受体细胞的；即使进入了受体细胞，一般也不能进行扩增复制和功能表达。这是因为所得到的单独外源基因 DNA 片段不带有复制系统及在受体生物细胞中进行功能表达的调控系统。

在基因工程中，大多是利用某种合适运载工具将外源 DNA 片段送入受体生物细胞来克服上述困难的。这种携带外源基因进入受体细胞的运载工具被称作基因工程的载体 (vector)。

基因工程载体的本质是 DNA。经过人工构建的载体，不仅能与外源基因连接重组从而将外源基因导入受体细胞，而且还能利用受体细胞的有关调控系统，使导入的外源基因在受体细胞中得以扩增复制和功能表达。

按照介导的作用目的，可将基因工程载体主要分为克隆载体和表达载体。一般克隆载体中都有一个松弛性复制系统，能使外源 DNA 在受体生物细胞中扩增复制；而一般表达载体中都有一个受体生物细胞所要求的包括启动子序列在内的调控系统，能使外源基因在受体生物细胞中进行功能表达。

按照导入的受体生物，一般可将基因工程载体分为大肠杆菌 (原核细胞) 载体、酵母载体、植物载体、动物载体等。

在此，首先讨论在基因工程中最常用的将外源 DNA 导入原核生物细胞的大肠杆菌载体，然后分别讨论将外源 DNA 导入真核生物细胞的酵母载体、植物载体和动物载体。

(一) 大肠杆菌载体

大肠杆菌载体主要有以下几类：①质粒载体；②噬菌体载体；③柯斯质粒 (黏粒) 载体。

1. 质粒载体

(1) 质粒的生物学特性。质粒 (plasmid) 是指细菌等生物细胞内一类独立于染色体外而能自我复制的遗传物质。一般为双链 (double strand, ds) 的共价闭合环状 DNA (covalently closed

circular DNA, ccc DNA)。

质粒分子的长度一般为 1~200 kb。不同质粒的分子量差异显著,小质粒的分子量约为 10^6 ,仅能编码 2~3 种中等大小的蛋白质;而大质粒的分子量可达 10^8 。

质粒依赖于宿主编码的酶和蛋白质进行复制和转录,是宿主的共生物。其也可编码宿主染色体所不具有的基因,表现出非染色体控制的遗传性状,赋予宿主细胞新的遗传特性,例如,抗抗生素、抗重金属、产生抗生素、产生细菌素、产生限制酶与甲基化酶、诱致植物结瘤等。

质粒的不亲和性(plasmid incompatibility),也称不相容性,是指在没有选择压力的情况下,两种亲缘关系密切的不同质粒不能在同一宿主细胞中稳定共存的现象。由于在进入同一单细胞后,两种亲缘关系较近的不同质粒的拷贝数并不总能保持相同,因此其中一种质粒在细胞增殖过程中会被逐渐排斥(稀释)掉。

彼此不相容的质粒属于同一个不亲和群(incompatibility group),而彼此能够共存的亲和质粒则属于不同的不亲和群。

(2) 质粒的分类。有三种分类方法:根据赋予宿主的遗传性状分类、根据转移能力分类和根据复制控制类型分类。

①根据赋予宿主的遗传性状,一般大肠杆菌质粒可分为 F 因子(性因子)、R 质粒(抗药性因子)、Col 质粒(产生大肠杆菌素因子)等。F 因子可使宿主染色体部分基因随其一起转移至本不存在该质粒的宿主内,同时其自身部分基因亦可保留于原宿主染色体中。R 质粒可编码一种或数种抗生素抗性基因,并能转移至缺乏该质粒的适当宿主中,使后者获得同样抗性。Col 质粒编码大肠杆菌素基因,该基因的表达产物大肠杆菌素是一类可使不带 Col 质粒而亲缘关系密切的菌株死亡的蛋白质。

②根据转移能力,一般可将大肠杆菌质粒分为接合型质粒和非接合型质粒。接合型质粒除可自我复制外,也编码细菌配对和质粒结合转移基因。而非接合型质粒不能自主转移,但当在宿主中同时存在接合型质粒和非接合型质粒时,非接合型质粒亦可被转移。通过与接合型质粒共存所引起的非接合型质粒的转移过程被称为迁移作用(mobilization)。从基因工程的安全方面考虑,利用非接合型质粒作为克隆载体更为合适。

③根据复制控制类型,一般可将大肠杆菌质粒分为严紧型复制控制质粒和松弛型复制控制质粒。一种质粒在一个细胞中存在的数目称为质粒拷贝数(plasmid copy number)。控制质粒拷贝数的基因位于质粒上一个包括 DNA 复制起点在内的 DNA 区域。通常一个质粒只含一个复制起始区。由融合产生的极少数质粒会含不止一个复制子,但是也只有一个复制子具有活性。

严紧型复制控制质粒的复制与宿主染色体的复制同步,并与宿主蛋白质的合成有关,而与 DNA 聚合酶 I 的活性无关。如果宿主蛋白质的合成终止,质粒与宿主染色体的复制也停止。因此,每个宿主细胞中只能达到 1 至数个拷贝。然而,松弛型复制控制质粒的复制与宿主染色体的复制不同步,其与 DNA 聚合酶 I 的活性有关,而与蛋白质的合成无关。当宿主蛋白质的合成终止时,质粒仍可复制。因此,每个宿主细胞中的质粒拷贝数可达 10~200 个。

一种质粒属于严紧型还是松弛型也不是绝对的,这往往同宿主的状况有关。同一质粒在不同的宿主细胞中可能具有不同的复制控制类型。这也说明质粒的复制不仅受自身的制约,而且受宿主的控制。

在需提取松弛型复制控制质粒时，通常用氯霉素等蛋白质合成的抑制剂处理宿主，以阻止其蛋白质合成及染色体复制，从而可使宿主细胞中的质粒拷贝数增至数千个。因此，在基因工程中，为提高工程菌表达效率，一般选用属于松弛型复制控制质粒的载体。

需要指出的是，质粒的转移能力、分子大小、复制控制类型之间有一定的相关性。在一般情况下，接合型质粒分子量大，拷贝数少（严紧型）；而非接合型质粒分子量小，拷贝数多（松弛型）。

(3) 质粒载体的条件及选择。质粒克隆载体是指能将外源基因携带至宿主细胞并可在其中自主复制的质粒 DNA。

理想的质粒克隆载体一般具备以下条件：①分子结构中具有多个单一限制酶切位点，具有易被检测的选择标记基因，且切点位于选择标记基因上；②能插入、运载一定大小的外源基因；③在携带外源基因前后在宿主细胞内均能自主复制；④在与外源基因构建重组质粒后具有转化功能；⑤分子量小，易于操作，一般为松弛型复制控制；⑥容易控制，安全可靠。

在基因工程中，需根据具体情况选择适当质粒克隆载体。如果克隆的目的是获取大量高纯度的 DNA 片段，那么可选用属于松弛型复制控制质粒的载体，例如：ColEI；如果有些外源基因用高拷贝数质粒载体克隆后，其产物含量过高会干扰寄主细胞的新陈代谢活动，那么可选用属于严紧型复制控制的 pSC₁₀₁ 质粒派生的载体。

现已通过 DNA 重组技术构建了许多质粒克隆载体供基因工程应用，例如：pBR₃₂₂、pUC 系列（例如：pUC₁₈、pUC₁₉）、M₁₃mp 系列等。

(4) 质粒载体例解。

①pBR₃₂₂：它曾是一种应用最为广泛的克隆载体，现许多应用广泛的质粒载体都由其衍生而来。其带有氨苄青霉素抗性基因 *amp^r*，四环素抗性基因 *tet^r* 两个选择标记基因，属于松弛型复制控制质粒载体。

该质粒载体 DNA 分子由 4.363 kb 组成，现已知 27 种限制酶在其上有单一识别序列、切割位点。其中 8 种限制酶，即 EcoR V、Nhe I、BamH I、Sph I、Sal I、Xma III、Nru I 和 BspM I 的单一切割位点位于四环素抗性基因 *tet^r* 之中，2 种限制酶，即 Cla I 和 Hind III 的单一切割位点位于该基因的启动区内。外源 DNA 在这 10 个限制酶切割位点上的任一插入都会导致 *tet^r* 基因的失活；4 种限制酶，即 Sca I、Pvu I、Pst I 和 Ppa I 的单一切割位点位于氨苄青霉素抗性基因之中。外源 DNA 在这 4 个限制酶切割位点上的任一插入都会导致 *amp^r* 基因的失活。

为了方便起见，统一规定该环状质粒载体 DNA 分子中核苷酸的计数从 EcoR I 的识别序列开始。在该识别序列 GAATTC 中，以第一个 T 为核苷酸 1，然后沿着从 *tet^r* 基因到 *amp^r* 基因的方向顺序计数，如此画出该质粒的碱基序列结构图。在此基础上，任何两个识别序列间的距离均可准确地计算出来。这也为其他未知 DNA 片段长度的测定提供了相应的标准分子量。

②Bluescript M₁₃₊、Bluescript M₁₃₋：其是一对带有 M₁₃ 噬菌体 DNA 复制起点 *ori* 的质粒载体。这两个质粒载体由该复制起点 *ori* 以互为相反的方向分别插入到含有 T₃ 噬菌体启动子和 T₇ 噬菌体启动子这样两个启动子的两个同样的 pUC 衍生质粒载体中构建而成。因此，这对载体可在体内或在体外产生互补于插入到其多克隆位点的外源双链 DNA 中任一条链的单链 DNA 或 RNA。

在 Bluescript SK (M_{13-}) 中, Sac I 位点紧接于 T_3 噬菌体启动子下游, Kpn I 位点紧接于 T_7 噬菌体启动子下游; 在 Bluescript KS (M_{13-}) 中, 多克隆位点的方向正相反。

2. 噬菌体载体

(1) 噬菌体的生物学特性。噬菌体 (bacteriophage) 是一类细菌病毒的总称。

不同种类的噬菌体 (颗粒) 在外形上差别很大。大多数噬菌体颗粒由呈 20 面体的头部及尾部构成, 例如 λ 噬菌体; 还有一些噬菌体颗粒为线状体形, 例如 M_{13} 。在结构上, 噬菌体颗粒比质粒复杂。噬菌体颗粒的外壳是蛋白质, 内部是核酸。该核酸最常见的构型是线状双链 DNA, 此外, 还有环状双链 DNA、线状单链 DNA、环状单链 DNA 等。在噬菌体 DNA 分子中, 除具有复制起点外, 还有编码外壳蛋白质等的基因。

噬菌体的感染效率极高。如果在琼脂平板上感染生长着的细菌, 即以最初被感染的细胞所在位置为中心逐渐向四周均匀扩展, 最后在琼脂平板上形成明显的噬菌斑, 此即被感染的细菌细胞被噬菌体裂解之后留下的空斑。

噬菌体的生命周期可分为溶菌周期和溶原周期。溶菌周期是指噬菌体吸附到宿主细胞表面后注入 DNA, 经过 DNA 复制及蛋白质合成, 组装成子代噬菌体颗粒, 最后使宿主细胞破裂, 释放出子代噬菌体颗粒的生长周期。只具有溶菌周期的噬菌体被称为烈性噬菌体。溶原周期是指噬菌体在感染过程中不产生子代噬菌体颗粒, 而将噬菌体 DNA 整合到宿主细胞染色体 DNA 中, 成为其组成部分的生长周期。具有溶原周期的噬菌体被称为温和噬菌体。

具有一套噬菌体完整基因组的细菌被称为溶原性细菌 (lysogen)。以温和噬菌体感染细菌培养物使之形成溶原性细菌的过程被称为溶原化 (lysogenization)。整合的噬菌体 DNA 是指插入宿主细胞染色体 DNA 中的噬菌体 DNA; 而以质粒 DNA 分子形式存在的噬菌体 DNA 被称为非整合的噬菌体 DNA。

经过许多世代之后, 溶原性细菌也能开始溶菌周期。噬菌体基因组以单一 DNA 片段的形式从宿主细胞染色体上删除下来的过程被称为溶原性细菌的诱发。

(2) λ 噬菌体载体。如上所述, λ 噬菌体颗粒由头与尾两部分组成。头部装载了其整个基因组 λ DNA。 λ DNA 为一长度约 48.5 kb 的线状双链 DNA 分子, 可以分为三个区段: 左臂、中央区和右臂。在左臂和右臂的 5' 处各有一 12 个碱基长的互补单链 (从而构成黏性末端)。当 λ 噬菌体感染宿主细胞时, λ DNA 被注入宿主细胞后会迅速通过黏性末端的互补作用形成环状双链 DNA 分子。这种由黏性末端结合形成的双链区段称作 cos 位点 (cohesive-end site)。

λ DNA 至少包括 61 个基因。其中大约半数基因参与噬菌体生命周期活动, 因此这类基因称作 λ 噬菌体的必要基因, 位于其左臂和右臂; 另一部分基因在被外源基因取代后并不影响噬菌体的生命周期活动, 因此这类基因称作 λ 噬菌体的非必要基因, 位于其中央区。

λ 噬菌体在宿主细胞中繁殖时, 复制的 DNA 必须被包装到先已组装好的头部, 并再接上尾巴后才能成为成熟的噬菌体颗粒, 才具备感染大肠杆菌细胞的能力。噬菌体要具有感染性, 被包装的 DNA 必须具有一定的长度。野生型 λ 噬菌体 DNA (48.5 kb) 被包装的效率最高, 并且所形成的噬菌体颗粒具有最强的感染性。如果被包装的 DNA 与 λ 噬菌体载体的总长度短于野生型 λ DNA 长度的 78% 或者长于野生型 λ DNA 长度的 105%, 那么就不能形成具有感染性的噬菌体颗粒。

λ 噬菌体载体中取代了非必要基因的外源基因可随宿主细胞一起复制和增殖。 λ 噬菌体载体是最早使用的克隆载体，其在基因工程中始终发挥着重要的作用。

λ 噬菌体载体的优点在于：①可携带较长的外源 DNA 片段。②重组后的 DNA 分子可在体外被包装成噬菌体颗粒。与用 DNA 直接转染细菌相比，包装成的噬菌体颗粒具有更强的感染宿主细胞的能力。③重组的噬菌体容易筛选和贮存。

① λ 噬菌体载体的分类：根据插入方式，一般可将 λ 噬菌体载体分为插入型载体和置换型载体。

A. 插入型载体 (insertion vector)，是指在基因组的非必要基因区内有一种或不止一种限制酶的单一酶切位点可供外源 DNA 插入，而不缺失其本身任何片段的 λ 噬菌体载体。由插入型载体得到的重组 DNA 分子都比原载体长。

插入型载体可容纳的外源 DNA 片段相对较小，一般在 10 kb 以内。

λ 噬菌体插入型载体广泛应用于 cDNA 以及小片段 DNA 的克隆。

常用的插入型载体有 λ gt₁₀、 λ gt₁₁、 λ gt₁₈~ λ gt₂₃ 系列载体、 λ ZAP 等。

B. 置换型 (取代型) 载体 (replacement vector)，是指在基因组的非必要基因区内两个或两个以上的限制酶切位点间的 DNA 区段可被插入的外源 DNA 片段所置换的 λ 噬菌体载体。

置换型载体容纳外源 DNA 片段大小的范围一般在 9~22 kb 之间。

常用的置换型载体有 EMBL 系列载体等。

需要指出的是，有些 λ 噬菌体载体兼有插入和置换两种外源 DNA 片段的插入方式，这具体取决于载体与外源 DNA 末端匹配的限制酶切位点的种类和数目等。

② λ 噬菌体载体的选择：并没有一种可以适于克隆所有 DNA 片段的 λ 噬菌体载体。因此，必须在许多载体中选择一种更适用于特定研究目的的载体。在具体选择时，应该考虑以下几点。

A. 如果要从染色体 DNA 来构建基因组文库，那么可以选择置换型的 λ 噬菌体载体，因其可容纳 DNA 较大片段。由于常用 *Sau*₃*A* I 或 *Mbo* I 部分酶解染色体 DNA 以产生近随机切割的大片段，而这些片段的黏性末端序列结构要求选用含有 *Bam*H I 位点的载体，因此常选用 λ EMBL₃、 λ EMBL₄ 及 *Charon*₂₈ 等置换型载体构建染色体基因组文库。

B. 如果要从染色体 DNA 中分离某一基因，而又不需构建完整基因组文库，那么选择的自由度就较大。选择主要取决于酶解染色体 DNA 所用的限制酶种类，例如，如果某一待分离基因包含于染色体 DNA 的 *Eco*R I 的酶解产物中，那么首先确定选择含有 *Eco*R I 位点的载体，然后再根据含有待分离基因的 DNA 片段的大小确定选择置换型载体或插入型载体。

C. 如果需要构建 cDNA 文库，那么常选 λ gt₁₀ 或 λ gt₁₁ 插入型载体；如果考虑选用抗体探针，那么常选 λ gt₁₁ 这一有效表达载体。

③ λ 噬菌体载体例解：

A. λ gt₁₀，该载体是专门为在其单一的 *Eco*R I 限制酶切位点上克隆小的 cDNA 片段 (约 6kb) 而设计的。当外源 DNA 的量十分有限时，常用此载体。该载体克隆效率很高。

B. λ gt₁₁，该载体是一个可用于免疫学筛选的载体。外源 DNA 片段 (可长达 7.2 kb) 插入其 *lacZ* 基因内的单一 *Eco*R I 位点。如果该插入 DNA 片段的读框与其 *lacZ* 基因的读框吻合，那么就可表达融合蛋白，并可以用抗体进行筛选。

C. λ ZAP, 该载体含有质粒序列, 在该质粒序列内有一多克隆位点。当该载体进入宿主菌后, 该质粒部分可从载体上被切下, 形成质粒载体 Bluescript SK (M_{13-})。在该载体的单一限制酶切位点上可插入长达 10 kb 的外源 DNA 片段。由于该载体的多克隆位点位于其 *lacZ* 基因内, 因此如果插入外源 DNA 片段的读框与 *lacZ* 的读框吻合, 那么就可表达融合蛋白, 并可以用抗体进行筛选。

D. λ EMBL₃ 和 λ EMBL₄, 该系列载体为一般用于克隆大片段 (可达 20 kb) 基因组 DNA 的置换型载体。其 BamH I 位点两侧分别有 EcoR I 位点和 Sal I 位点, 特别适合于克隆用 *Sau3A* I 部分酶解的外源 DNA 片段。克隆后还可用 EcoR I 和 Sal I 将外源 DNA 片段从重组体上切出。 λ EMBL₃ 与 λ EMBL₄ 两载体的多克隆位点方向相反。

(3) M_{13} 噬菌体载体。

① M_{13} 噬菌体的特性: M_{13} 是丝状噬菌体, 含有长度为 6 407 个核苷酸的闭合环状单链 DNA 基因组。当 M_{13} 感染宿主大肠杆菌细胞时, 侵入的单链噬菌体 DNA 转变为双链复制型 (RF)。双链复制型在复制时产生大量的单链 DNA。单链 DNA 再被外壳蛋白包装为成熟的噬菌体颗粒。在宿主大肠杆菌细胞生长过程中, 子代噬菌体颗粒被释放出来。

② M_{13} 噬菌体载体的利用: M_{13} 噬菌体经改造后可以作为单链 DNA 载体或双链 DNA 载体。将 M_{13} 噬菌体改造成为克隆载体, 主要利用 M_{13} 基因组中一段 507 个核苷酸区域的基因间隔序列 (IS)。由于 IS 区是 M_{13} 基因组中惟一的非必要区, 因此该区可接受外源 DNA 的插入而不影响 M_{13} 的活力。

M_{13} 噬菌体载体主要具有以下几点突出优点: ①由于 M_{13} 单链 DNA 的复制型呈双链环形, 因此此时的 DNA 可同质粒 DNA 一样进行提取和体外操作; ②不论是双链的还是单链的 M_{13} DNA 均能感染宿主细胞, 产生噬菌斑或形成侵染菌落; ③由于 M_{13} 是丝状噬菌体, 其长度不受外壳蛋白包装的限制, 因此根据重组 DNA 的长度, 被包装成的噬菌体颗粒可大可小。

M_{13} 噬菌体载体主要用于为以 Sanger 双脱氧核苷酸末端终止法测定 DNA 序列制备单链 DNA 模板。

③ M_{13} 噬菌体载体例解:

A. M_{13} mp₇, 该载体有单一的 Pst I 位点, 成对的 EcoR I、BamH I、Sal I、Acc I、Hinc II 位点。单一的位点可供外源 DNA 的插入, 成对的位点可供外源 DNA 的置换。

B. M_{13} mp₈ 和 M_{13} mp₉, 这两个载体均具 EcoR I、BamH I、Pst I、Hind III、Sma I、Xma I、Sal I、Acc I、Hinc II 等 9 种限制酶的单一酶切位点。两者上述酶切位点的排列顺序相同, 但是方向相反。

3. 柯斯质粒载体 柯斯质粒载体 (Cosmid vector), 也称黏粒载体, 是指一类由人工构建的含有 λ DNA 的 *cos* 位点和质粒复制子的特殊类型的质粒载体。其最初是为克隆和增殖基因组的大片段 DNA 而设计的。

(1) 柯斯质粒载体的组成。柯斯质粒本身的分子量较小, 一般为 4~6 kb。其基因组由以下部分组成: ①1 个质粒复制起始区域复制子; ②至少 1 个抗药性选择标记基因; ③至少 1 个限制酶的单一识别切割位点; ④1 个 λ 噬菌体黏性末端片段 *cos* 位点。

(2) 柯斯质粒载体的特点。

①具有质粒载体的特性：它带有质粒的复制子，因此能像质粒 DNA 一样在寄主细胞内复制，也能在氯霉素的作用下进行扩增，也带有抗菌素抗性基因，有些还带有基因插入失活的克隆位点，为重组体的筛选提供了简便的标记。

②具有 λ 噬菌体载体的特性：它在与适宜长度的外源 DNA 片段重组后，可在体外包装成噬菌体颗粒，并能高效地转入对 λ 噬菌体敏感的大肠杆菌宿主细胞。进入宿主细胞后，也能像 λ 噬菌体一样进行环化。但是，由于不含有 λ 噬菌体的全部基因，因此不能通过溶菌周期形成子代噬菌体颗粒。

③具有高容量的克隆能力：质粒载体的克隆容量一般为 10 kb， λ 噬菌体载体的克隆容量理论极限值是 23 kb，一般为 15 kb 左右，而柯斯质粒载体的克隆极限可达 45 kb 左右。因此，柯斯质粒载体比质粒载体和 λ 噬菌体载体的克隆能力都要大得多。但是由于包装限制，柯斯质粒载体的克隆能力也有一个最低极限值，例如，5 kb 的柯斯质粒载体，只有插入至少 30 kb 长的外源 DNA 片段，才能包装成具有感染性的 λ 噬菌体颗粒。

(3) 柯斯质粒载体例解。用于在细菌中增殖真核 DNA 的柯斯质粒载体主要有 pJB₈、c₂RB、pcos₁EMBL 等。

①pJB₈：该载体含有 1 个氨苄青霉素抗性基因 *amp*^r、1 个 ColE I 复制起点、1 个单一 *cos* 位点和 4 个可用于克隆的限制酶切位点 (BamH I、EcoR I、Cla I 和 Hind III)。该载体长约 5.4 kb，因此可容纳长度为 33~46.5 kb 的外源 DNA 片段。

②c₂RB：该载体含有 1 个氨苄青霉素抗性基因 *amp*^r 和一个卡那霉素抗性基因 *kan*^r、1 个 ColE I 复制起点、两个 *cos* 位点和 4 个可用于克隆的限制酶切位点 (BamH I、EcoR I、Cla I 和 Hind III)。由于一段长约 1.7 kb 的片段 (含有卡那霉素抗性基因 *kan*^r 和 1 个 *cos* 位点) 将在包装过程中消失，因此该载体可容纳长度为 33~46.5 kb 的外源 DNA 片段，带有单个由该载体与外源目的基因重组的 DNA 分子的受体细胞将不产生对卡那霉素的抗性。

(二) 酵母载体

酵母是单细胞低等真核生物，其基因组大小仅为大肠杆菌基因组的 4 倍。酵母可人工培养，且繁殖迅速，并可像细菌一样进行实验操作。酵母的生命周期包括单倍体和二倍体两种形式，它对基因表达产物有完善的后加工系统。

1. 酵母载体的特点 现已构建了许多质粒载体等用于将外源基因导入酵母细胞。酵母载体的共同特点主要有以下几点：①能在大肠杆菌中克隆，且具较高的拷贝数。因此可使外源基因先在大肠杆菌中扩增，再在其帮助下导入酵母细胞。②含有在酵母中便于选择的遗传标记，这些标记一般能与大肠杆菌相应的突变体互补，例如 *Leu*⁺、*His*⁺ 等；有些酵母载体还带有用于大肠杆菌的抗生素抗性标记。③含有合适的限制酶切割位点，以便外源基因的插入。

2. 酵母载体的分类 根据复制方式，一般可将酵母载体分为整合型载体、复制型载体和附加体型载体。

(1) 整合型载体 (YIP)。该类载体由大肠杆菌质粒和酵母 DNA 片段构成。由于其酵母 DNA 片段提供的亮氨酸基因 (*leuZ*⁺) 部分不含有自主复制起始区，而只作为选择标记，因此该类载体在酵母细胞中不能自主复制。

该类载体可经转化作用导入受体酵母细胞。进入酵母细胞后的载体 DNA 通过与受体酵母染色体 DNA 的同源重组被整合到酵母染色体 DNA 上, 并随酵母染色体 DNA 一起遗传。这样, 载体 DNA 可以单拷贝基因形式稳定地遗传。

该类载体对酵母的转化率低 ($1 \sim 10$ 个转化子/ μg DNA), 拷贝数也低, 但转化子稳定。其多用于遗传分析等工作。

(2) 复制型载体 (YRP)。该类载体是将酵母 DNA 片段插入到大肠杆菌质粒中构成的。其中酵母 DNA 片段不仅提供了选择标记, 还携来自酵母染色体 DNA 的自主复制顺序 (ARS)。因为同时含有大肠杆菌和酵母的自主复制基因, 所以该类载体能在这两种细胞中存在和复制。因此, 该类载体属于穿梭载体。

所谓穿梭载体 (shuttle vector), 是指可在两种截然不同的生物细胞中复制的载体。各种穿梭载体在基因工程中被广泛的应用。

由于许多基因操作在大肠杆菌中进行更简便, 因此可利用上述穿梭载体先在大肠杆菌中进行真核基因的大量扩增, 然后再通过适当转化方法导入酵母细胞进行真核基因的进一步研究。

该类载体对酵母的转化率很高 ($10^2 \sim 10^3$ 转化子/ μg DNA), 拷贝数也较高。由于该类载体质粒以 cccDNA 分子形式存在, 因此可很容易将其从酵母中提取出来。但是, 转化子稳定性较低。

(3) 附加体型载体 (YEP)。该类载体一般由大肠杆菌质粒、 $2 \mu\text{m}$ 质粒及酵母染色体的选择标记组成。

$2 \mu\text{m}$ 质粒是酿酒酵母中的一个能独立复制的天然环状双链 DNA 结构的内源质粒, 其长度为 $2 \mu\text{m}$, 大小为 6.3 kb。通常 $2 \mu\text{m}$ 质粒 DNA 与蛋白质结合成复合物, 存在于核区。 $2 \mu\text{m}$ 质粒含有自主复制起始区 (ori) 和 STB 区。STB 区序列能使质粒在供体细胞中维持稳定。

该类载体对酵母的转化率极高 ($10^3 \sim 10^5$ 转化子/ μg DNA), 拷贝数也很高 ($25 \sim 100$ 分子/细胞), 也较稳定。因此, 该类载体是基因克隆中常用的载体。

如上所述, 在酵母中使用的克隆载体在转化后拷贝数与转化子稳定性之间存在着一定的矛盾。拷贝数低的 (例如 YIP), 转化子稳定性高; 而拷贝数高的 (例如 YRP), 转化子稳定性较低。因此, 在基因操作中, 要根据不同使用目的进行选择 and 改造载体。

(三) 植物载体

植物载体具体包括农杆菌质粒载体、病毒载体等, 农杆菌质粒载体又可分为根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*, At) 诱导肿瘤质粒 (tumor-inducing plasmid, Ti plasmid) 载体和发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*, Ar) 诱导发根质粒 (root-inducing plasmid, Ri plasmid) 载体。在所有这些植物载体中, 根癌农杆菌诱导肿瘤质粒载体是最主要的。因此, 在此主要述及根癌农杆菌诱导肿瘤质粒载体。

根癌农杆菌主要感染被子植物中的双子叶植物, 也能感染裸子植物及被子植物中的一些单子叶植物等。

根癌农杆菌感染植物会致其形成冠瘿瘤, 而这种肿瘤的形成是由根癌农杆菌中的质粒引起的。因此, 该质粒被称为诱导肿瘤质粒, 简称 Ti 质粒。

1. Ti 质粒的基本性质 Ti 质粒是根癌农杆菌染色体外的遗传物质, 为共价闭合环状的双链

DNA 分子。其分子量为 1.2×10^8 ，长约 185 kb，相当于细菌染色体的 3%~5%。

根据植物冠瘿瘤中所合成的冠瘿碱的种类，一般可以将 Ti 质粒分为以下类型：章鱼碱型 (octopine)、胭脂碱型 (nopaline)、农杆菌碱型 (agropine) 等。

2. Ti 质粒的基本结构 一般可将 Ti 质粒分为四个结构区域：T-DNA 区、Vir 区、Con 区和 Ori 区。

(1) T-DNA 区 (transferred-DNA region)。T-DNA 是在根癌农杆菌侵染植物细胞时，从 Ti 质粒上切割下来转移到植物细胞内的一段 DNA，因此，被称为转移 DNA。该 DNA 片段上的基因与肿瘤的形成有关。

(2) Vir 区 (virulence region)。该区段上的基因能够激活 T-DNA 转移，使根癌农杆菌表现出毒性，因此，被称为毒性区。T-DNA 区与 Vir 区在 Ti 质粒 DNA 上彼此相邻，合起来约占 Ti 质粒 DNA 的 1/3。

(3) Con 区 (region encoding conjugation)。该区段上存在着与细菌间接合转移有关的基因 (*tra*)，调控 Ti 质粒在根癌农杆菌之间的转移。冠瘿碱能激活 *tra* 基因，诱导 Ti 质粒的转移。因此，该区被称为接合转移编码区。

(4) Ori 区 (origin of replication)。该区段上的基因调控 Ti 质粒的自我复制，因此，被称为复制起始区。

3. 改造 Ti 质粒作为植物基因工程载体的必要性与可能性

(1) 必要性。尽管 Ti 质粒享有“天然遗传载体”的美誉，但是野生型 Ti 质粒却不能直接作为植物基因工程载体。其原因主要有以下几点：

①野生型 Ti 质粒上分布着多种限制酶的多个酶切位点，但在其上难以找到可利用的单一酶切位点。因此，不能通过体外 DNA 重组技术直接向其导入外源基因。

②Ti 质粒不能在大肠杆菌中复制。即使得到重组质粒，也只能在根癌农杆菌中进行复制扩增。而根癌农杆菌的接合转化率很低 (10%左右)。因此，在常规分子克隆条件下，几乎不能通过 Ti 质粒的体外操作构建 T-DNA 中只有单一切点的载体。

③T-DNA 区含有多个编码基因，其中 *onc* 基因的产物干扰宿主植物中内源激素的平衡，使得导入野生型 Ti 质粒 T-DNA 的植物细胞组织形成肿瘤，不能分化以及植株再生。

④野生型 Ti 质粒上存在不少对 T-DNA 转移不起任何作用的基因。此外，其分子量太大，一般在 200 kb 左右，比 pBR₃₂₂ 质粒大 50 倍左右，在基因工程中难以操作。

(2) 可能性。

①T-DNA 的结构及功能：T-DNA 长约 23 kb。虽然根癌农杆菌 Ti 质粒 T-DNA 区的基因来自细菌，但是其却可以在真核细胞内有效地表达。在 T-DNA 的 5' 端和 3' 端都有真核表达信号，例如：TATA 盒、AATAA 盒、poly (A) 等。

T-DNA 的两端左右边界各有 25 bp 的重复序列，即边界序列 (border sequence)，分别称为左边界 (BL 或 TL) 和右边界 (BR 或 TR)。该 25 bp 边界序列具体为 TGACA CGATA TATTG GCGGG TAAAC，其属于保守序列。左边界序列在某些情况下会有所变化，但是右边界序列通常更为保守。如果左边界发生缺失突变，T-DNA 仍然能使植物形成肿瘤。但是，如果右边界发生缺失突变，T-DNA 就不再能使植物形成肿瘤，这时几乎完全没有 T-DNA 的转移，这表明右边

界在 T-DNA 的转移中具有重要作用。

而 T-DNA 的转移与 T-DNA 区域的其他基因序列无关。在根癌农杆菌感染植物细胞后, Ti 质粒中的 T-DNA 能随机地共价整合到植物染色体 DNA 中。T-DNA 的整合为非常规重组。T-DNA 右末端在靶 DNA 序列的识别及连接中是必需的, 而 T-DNA 左末端及靶 DNA 序列的两个末端则参与部分配对和 DNA 修复。

② Vir 区的功能: 除 T-DNA 外, Ti 质粒中的 Vir 区也是根癌农杆菌所必需的。Vir 区毒性基因具有决定根癌农杆菌对植物的感染以及 T-DNA 的进入和整合的功能。

综上所述, 可以去除致瘤基因和其他一些非必要序列, 在 T-DNA 的非必要基因区设置多克隆位点以便外源基因插入等, 将根癌农杆菌 Ti 质粒改建为基因工程载体。

需要指出的是, 大肠杆菌具有能与根癌农杆菌高效接合转移的特性。因此, 可以首先将 T-DNA 片段克隆到大肠杆菌质粒中, 然后插入外源基因, 最后通过接合转移将外源基因引到根癌农杆菌 Ti 质粒上。

4. 植物基因工程中几种载体的定义

(1) 中间克隆载体 (intermediate cloning vector)。这是指插入了根癌农杆菌 Ti 质粒 T-DNA 片段、目的基因、标记基因等的大肠杆菌质粒载体。其是构建中间表达载体的基础质粒。

(2) 中间表达载体 (intermediate expression vector)。这是指含有可使外源基因在植物细胞中表达的特异启动子的中间克隆载体。它是构建植物表达载体的基础质粒。

(3) 卸甲载体 (disarmed vector)。卸甲载体多指去除了编码致瘤作用基因、经改造的根癌农杆菌 Ti 质粒载体。其是构建植物表达载体的受体质粒。

(4) 植物表达载体 (plant expression vector)。这是指最后将目的基因导入植物细胞表达的载体。它由中间表达载体和卸甲载体构建而成。根据结构特点, 一般可将植物表达载体分为两类: 一元载体系统和二元载体系统。

5. 植物表达载体

(1) 植物表达载体 (中间表达载体) 中常用的启动子。

① pNos: 该启动子来源于根癌农杆菌 Ti 质粒, 能使外源基因在植物细胞中表达。此为无组织特异性的启动子。

② pCaMV35 S: 该启动子来源于花椰菜花叶病毒 (CaMV) 的 DNA, 能使外源基因在植物细胞中强烈表达。它是无组织特异性、无发育时期特异性的启动子。由 CaMV 35 S 启动子、外源结构基因及根癌农杆菌 Ti 质粒 Nos 基因 3' 端非编码区组成的嵌合基因能在植物细胞中迅速高效表达。

(2) 一元载体系统。该类载体是指中间表达载体与 Ti 质粒卸甲载体两种载体之间通过同源重组所产生的一种共整合复合型载体。由于其卸甲载体的 T-DNA 区与 Vir 区相连, 因此它又被称为顺式载体 (cis-vector)。

一元载体系统目前主要有两种载体: 共整合载体和拼接末端载体。

① 共整合载体 (co-integrated vector): 其同源序列为中间表达载体与 Ti 质粒卸甲载体共有的 pBR₃₂₂ 部分; 其卸甲载体的左边界与右边界在同一个 Ti 质粒上; 它带有的 pBR₃₂₂ 部分可能影响被转化植物中外源基因的稳定性。

②拼接末端载体 (split-end vector, SEV): 其同源序列为中间表达载体与 Ti 质粒卸甲载体共有的 LIH; 这两个 LIH 序列在同源重组前分别处于两个不同质粒上; 该类载体的左边界与右边界也分别来自两个质粒; Ti 质粒卸甲载体的右边界缺失, 保留左边界, 而中间表达载体具有右边界以及与 Ti 质粒卸甲载体同源的 LIH; 该类载体不带有 pBR₃₂₂ 序列, 避免了该序列对被转化植物中外源基因稳定性的影响。因此, 该类载体是更有效的共整合复合型载体。

所谓 LIH (left inside homology), 即左边界内部同源序列, 是指 Ti 质粒卸甲载体 T-DNA 左边界内部的致瘤基因及右边界等缺失后的 T-DNA 的保留部分。

(3) 双元载体系统。双元载体 (binary vector) 系统是指由两个分别含 T-DNA 和 Vir 区的相容性突变 Ti 质粒构成的双质粒系统。由于其 T-DNA 区与 Vir 区分别处于两个独立的 Ti 质粒上, 可以反式激活 T-DNA 的转移, 因此其又被称为反式载体 (trans-vector)。

①双元载体系统的构建原理: 如上所述, Ti 质粒上的 Vir 基因与 T-DNA 具有反式作用, 即 Vir 基因可以反式激活 T-DNA 的转移。根据这一原理构建的使 T-DNA 和 Vir 基因分别处于两个不同的 Ti 质粒上或两个不同的复制子上的双元载体系统可以激活 T-DNA 的转移, 使插入其中的外源基因一起导入植物细胞中。双元载体系统含有广宿主范围质粒的复制起始位点, 可以在任何农杆菌宿主中自主复制。

双元载体系统一般包括两个 Ti 质粒: 微型 Ti 质粒和辅助 Ti 质粒。

微型 Ti 质粒 (mini-Ti) 是指含有 T-DNA 左边界和右边界、复制起始位点、选择标记基因、多克隆位点等而缺失 Vir 基因的 Ti 质粒。它相当于前述的中间表达载体。

辅助 Ti 质粒 (helper Ti) 是指含有 Vir 基因的 Ti 质粒。它相当于前述的 Ti 质粒卸甲载体。

②双元载体的构建: 双元载体的构建就是将微型 Ti 质粒转入含有辅助 Ti 质粒的根癌农杆菌中。具体途径有二: 一是直接用纯化的微型 Ti 质粒转化速冻的根癌农杆菌感受态细胞; 一是采用三亲杂交法。三亲杂交法 (triparental mating) 是指将三种相关的菌株混合一起培养进行杂交的方法。

微型 Ti 质粒均能在大肠杆菌 pRK₂₀₁₃ 质粒协助下, 通过三亲杂交法而接合转移到含有辅助 Ti 质粒的根癌农杆菌中。大肠杆菌 pRK₂₀₁₃ 质粒由于不能在根癌农杆菌中复制而最终将消失, 而含有微型 Ti 质粒和辅助 Ti 质粒的根癌农杆菌可以直接用于植物细胞的转化。

(4) 一元载体系统与双元载体系统的比较。

①双元载体不需要经过共整合过程。因此, 双元载体系统中的两个质粒不必含有同源序列, 而且构建操作步骤比较简单。

②微型 Ti 质粒具有大肠杆菌质粒的复制起点, 能在大肠杆菌宿主中复制, 使其质粒拷贝数增加 10~100 倍。

③微型 Ti 质粒分子量小 (10 kb), 可以直接对其进行体外遗传操作, 而且将其导入根癌农杆菌也比较容易。

④双元载体系统在外源基因转入植物细胞前, 无须进行同源重组。因此, 插入双元载体系统外源基因的可能变异比插入一元载体系统外源基因的可能变异小。

⑤一元载体系统的重组频率很低, 而双元载体系统两个质粒的接合频率较高。一般后者比前者至少高 4 倍。

⑥ 双元载体系统比一元载体系统对植物的转化效率高。

⑦ 一元载体系统构建成功后工程菌的稳定性较好；而双元载体系统相应稳定性较差，容易丢失。

6. 在植物载体中常用的标记基因 在植物载体中设置标记基因的目的在于可以对重组子、转化体进行选择 and 筛选。

标记基因一般需要具备以下几个条件：① 编码一种不存在于正常植物细胞中的酶；② 基因较小，可以构成嵌合基因；③ 能在转化体中得到充分表达；④ 检测容易，并能定量分析。

根据功能特性，一般可将标记基因分为两类：选择标记基因和筛选标记基因。

选择标记基因的功能主要是以其表达产物给予植物细胞一种选择压力，使得未被转化的细胞不能生长、发育、分化；而已被转化的细胞对该表达产物具有抗性，能够正常生长、发育、分化，从而将已被转化的细胞选择出来。例如：*Npt-II*（新霉素磷酸转移酶）基因就是一种选择标记基因。

筛选标记基因的功能主要是给已被转化的细胞做一种标记，以便其被检测和识别。因此，筛选标记基因也称为报告基因。例如：*Gus*（ β -葡糖醛酸糖苷酶）基因就是一种筛选标记基因。

(1) 选择标记基因。

① *Npt-II*（neomycin phosphotransferase II，新霉素磷酸转移酶）基因：该基因是目前在植物基因工程中应用最广泛的选择标记。

其作用原理为：其表达产物通过酶促磷酸化作用使氨基葡萄糖苷类抗生素（例如卡那霉素、新霉素和 G_{418} 等）失活，从而解除其毒性。

Npt-II 基因对茄科植物的转化选择特别有效；但是，其对豆科植物和单子叶植物的转化选择效果不好。

② *HPT*（hygromycin phosphotransferase，潮霉素磷酸转移酶）基因：其作用原理为：其表达产物通过酶促磷酸化作用使潮霉素失活，从而解除其毒性。

需要指出的是，没有一种选择标记基因适合所有的植物；不同的选择标记基因对被转化植物细胞的生长发育及转化率具有不同的影响；即使同一种选择标记基因，在不同的选择压力下的影响也可能不同；不同的植物种类对选择压力的敏感程度相差很大。因此，在研究转化一种新的植物时，应该设计多种可替代的选择标记基因。

(2) 筛选标记基因。生理抗性的增强、无性系的变异等诸多原因使得在加有选择压力等的培养条件下再生的细胞、组织、器官、植株并非都是被转化体。因此，对这些再生材料都需进一步筛选以确定其是否属于真正的基因转化体。在这种情况下，利用筛选标记基因进行鉴定是一个重要方面。

需要指出的是，有些选择标记基因也可用作筛选标记基因（报告基因）。例如，*Npt-II* 基因在检测其新霉素磷酸转移酶活性及做定量分析时同样可以用作报告基因。

还要指出的是，在带有目的基因的情况下，常可不再附加报告基因；然而，选择标记基因一般不可缺少。

① *Gus*（ β -glucuronidase， β -葡糖醛酸糖苷酶）基因：该基因来自于大肠杆菌染色体。其在植物细胞中所产生的葡糖醛酸糖苷酶在检测上具有以下特点：A. 在一定条件下水解特定底物 5-溴-

4-氯-3-吲哚- β -D-葡糖醛酸酯(X-Gluc)生成蓝色物质,呈现蓝色沉淀。因此,既可用分光光度计测定,又可通过组织化学方法直接观察植物组织中的蓝色沉淀斑点。B.在一定条件下,水解特定底物4-甲基伞形酮酰- β -葡糖醛酸苷生成4-甲基伞形酮,产生荧光(455 nm)。因此,可用荧光光谱法测定,该法非常灵敏。C.检测简便、迅速,并能定量;D.*Gus*检测比*Npt-II*检测便宜,前者的检测成本是后者的1/2 000倍,而且也不需要使用放射性同位素。

②*Cat* (chloromycetin acetyl transferase, 氯霉素乙酰转移酶)基因:该基因来自于细菌转座子 Tn_9 。该基因表达产物氯霉素乙酰转移酶催化乙酰基由乙酰CoA转向氯霉素,生成3-乙酰氯霉素等。其在植物细胞中所产生的氯霉素乙酰转移酶在检测上具有以下特点:A.可用硅胶G薄层层析法等测定所生成的乙酰化产物以确定该酶的活性,但操作较繁琐;B.一般*Cat*基因表达产物不够稳定;③测定花费较大。鉴于以上所述,该法的使用现在已逐渐减少,而被*Gus*基因的检测所取代。

(3)植物基因工程载体中标记基因的选择策略。

①不同植物种类对不同标记基因的敏感程度相差很大。例如:卡那霉素抗性基因虽然已在许多植物中被成功地用作选择标记基因,但是对于某些植物无效。

②标记基因表达产物的有效性可能因被选择的靶外植体而异。例如,外植体的类型、大小及分化程度等都会影响标记基因的选用。

③在许多选择标记基因中,*Npt-II*基因是应用广泛、效果较好的一个。

7.常用植物基因工程载体例解 中间表达载体pBIN₁₉的特点如下:①含有来自pTi T₃₇的T-DNA左边界和T-DNA右边界;②在左边界和右边界之间的T-DNA区含有植物选择标记基因*Npt-II*;③在T-DNA区还含有来自M₁₃mp₁₉的*lacZ*基因;④在*lacZ*基因中含有一多克隆位点,可将外源基因插入其间,使*lacZ*基因被破坏,提供插入失活选择标记;⑤含有来自广宿主质粒pRK₂₅₂的RK₂复制起点;⑥含有来自链球菌的*kan^r*基因。

该微型Ti质粒可以在辅助质粒pRK₂₀₁₃的帮助下有效转移进含有辅助Ti质粒pAL₄₄₀₄的根癌农杆菌LBA₄₄₀₄;其重组T-DNA再在辅助Ti质粒Vir基因的反式作用下转移进被感染转化的植物细胞并整合进被感染转化的植物核基因组。

(四)动物载体

DNA病毒是外源DNA导入哺乳动物细胞的理想载体。其中,常用的载体由野生型猿猴空泡病毒40(SV₄₀)基因组DNA等改建而成。

1. SV₄₀病毒 猿猴空泡病毒40(simian vacuolating virus 40),即SV₄₀病毒,是一种小型20面体的颗粒,外壳由VP₁、VP₂和VP₃三种病毒蛋白构成,中间包装着长5.2 kb的环状基因组DNA。

SV₄₀基因组DNA分为早期和晚期两大区域。早期区在溶原生长中一直表达,而晚期区仅在DNA复制后的一段时间中表达,产生病毒外壳结构蛋白。早期区与晚期区之间则为复制起点。

SV₄₀对不同种的动物细胞具有不同的感染效应。如果以SV₄₀基因组DNA为载体,以其与外源DNA构建重组子转染猿猴细胞,那么能够产生具有感染性的病毒颗粒,并使宿主细胞裂解。

在此，猿猴细胞被称作受纳细胞 (permissive cell)。如果以 SV₄₀ 基因组 DNA 为载体，以其与外源 DNA 构建重组子转染啮齿动物细胞 (例如小鼠或者仓鼠细胞)，那么重组子不包装成具有感染性的病毒颗粒，而像质粒一样复制或者整合到宿主细胞染色体 DNA 中。在此，啮齿动物细胞被称作非受纳细胞 (Non permissive cell)。人类细胞介于上述两者之间被称作半受纳细胞 (semi-permissive cell)。

一般以野生型 SV₄₀ 基因组 DNA 构建穿梭载体。

2. SV₄₀ 病毒 DNA 载体 pSVK₃ 是一种广泛适用于哺乳动物细胞表达外源 DNA 的穿梭载体。该载体全长 3 919 bp，由质粒 DNA、噬菌体 DNA 和 SV₄₀ 病毒基因组 DNA 的元件组成，含有 1 个 ColE I 质粒复制起点、1 个 ϕ 丝状噬菌体复制起点、1 个 SV₄₀ 复制起始信号、1 个 *amp^r* 氨基青霉素抗性基因、1 个 T₇ 启动子、1 个 SV₄₀ 早期启动子、1 个 SV₄₀ 小 T 抗原拼接信号、1 个 SV₄₀ 早期区 mRNA 的 poly (A) 加尾信号及 1 个位于 SV₄₀ 早期启动子下游的多克隆位点 (含有 EcoR I、Kpn I、Sma I、Xba I、Sal I、Pst I、Apa I、Xho I 共 8 个单一酶切位点)。

四、基因工程中的一些主要分子生物学方法

(一) 核酸分子探针的标记

探针 (probe) 是指在化学及生物学意义上能与特定的靶分子发生特异性相互作用，并可被特殊的方法所测定的分子。例如，抗体-抗原、抗生物素蛋白-生物素等的相互作用都可认为探针与靶分子的相互作用。

核酸分子探针是指能与互补核酸序列复性杂交的特定已知核酸片段。

根据来源性质，一般可将核酸分子探针分为基因组 DNA 探针、cDNA 探针、RNA 探针、化学合成的寡核苷酸探针等。

在对基因组 DNA 探针作选择时，需要注意的是，在真核生物基因组中存在高度重复序列。因此，应尽可能选择基因的编码序列 (外显子) 作探针，避免使用内含子及其他非编码序列作探针。否则，可能会由于非特异性杂交而出现假阳性结果。

在对 cDNA 探针作选择时，需要注意的是，其 poly (dT) 可能导致非特异性杂交而出现假阳性结果。

在对 mRNA 探针作选择时，需要注意：① 大多数真核细胞 mRNA 的 poly (A) 也可能导致非特异性杂交；② RNA 极易被环境中的核酸酶降解而不易操作。

在对寡核苷酸探针作选择时，需要注意以下几点：① 探针长度一般为 10~50 bp，如果太短，特异性就降低；如果太长，杂交时间就延长。② 探针的 GC 含量应为 40%~60%，否则，非特异性杂交增加。③ 务必避免探针内部存在互补序列，即避免出现长于 4 bp 的碱基反向互补配对。否则，探针内部会形成发夹状结构。④ 避免同一碱基连续出现 4 次以上。⑤ 最好在计算机上与已知各基因序列进行同源性比较，避免其与非靶基因序列有 70% 以上的同源性或连续 8 个以上的碱基序列相同。

在从蛋白质多肽序列推测寡核苷酸序列以合成寡核苷酸探针时，需要注意以下几点：① 尽量选择那些含只有一种编码的氨基酸的多肽作为合成寡核苷酸探针的参照；② 优先选用使用频率最

高的密码子；③因为在真核基因中极少有 CG 序列的出现，所以当两个相邻氨基酸的最高频密码子相连会导致 CG 序列出现时，应将其中一种氨基酸的密码子换为次高频密码子，通常是将前一个密码子 NNC 换成 NNT；④参考同一基因家族的基因序列；⑤合成各种可能组合的寡核苷酸探针分别或混合进行探测。

然而，如果需要检测核酸分子探针，就必须先用合适的方法对探针进行标记。标记的核酸分子探针是核酸分子杂交、DNA 序列测定等技术的基础，已被广泛应用于基因工程中的克隆筛选、酶切图谱制作、DNA 序列测定等。

根据标记物的种类，可将核酸分子探针的标记法分为放射性同位素标记法和非放射性化合物标记法。

根据标记的方式，可将核酸分子探针的标记法分为体内标记法和体外标记法。

体内 (in vivo) 标记法是指将经放射性同位素标记的化合物作为底物引入活细胞，经细胞代谢处理而将生物大分子等加以标记的方法。

在体外标记法中，根据反应的种类，又可将核酸分子探针的体外标记法分为化学标记法和酶促标记法。

化学标记法是指利用标记物分子上的活性基团与探针分子上的基团发生化学反应而将标记物接到探针分子上的方法，例如，光敏生物素的标记。该法优点在于简单、快速、标记均匀。但是，每种标记物都有各自不同的标记方法，比较复杂。

酶促标记法是指将标记物预先标记在核苷酸上，然后利用酶促方法将核苷酸掺入到探针分子中，或将核苷酸上的标记基团交换到探针分子上的方法。该法适用于核苷酸的所有放射性同位素标记和部分非放射性化合物标记，例如生物素、地高辛等的标记。

根据酶促反应的条件，又可将酶促标记法分为切刻平移法、随机引物法和末端标记法等。

1. 切刻平移法

(1) 基本原理。该法是基于下述反应条件和下述酶活性进行的：在 Mg^{2+} 存在下 DNA 酶 I 的内切核酸酶活性、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 5'→3'核酸外切酶活性、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 5'→3'聚合酶活性以及反应体系中含有一种或多种标记核苷酸等。

(2) 一般流程。在 Mg^{2+} 的存在下，利用微量 DNA 酶 I 的内切核酸酶活性在待标记的 DNA 双链上随机形成单链切刻→利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 5'→3'核酸外切酶活性在切刻处将旧链从 5'端逐步切除→以互补的 DNA 单链为模板，利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 5'→3'聚合酶活性将 dNTP (其中一种或几种经过标记) 顺序连接到切刻 3'端的一OH 上，以延伸合成新的 DNA 单链，从而形成标记的 DNA 探针。

(3) 主要特点。该法是目前实验室中最常用的一种 DNA 探针标记法。该法适用于各种双链 DNA 的标记，不适用于单链 DNA 和 RNA 的标记，也不太适用于双链 DNA 小片段 (特别是小于 100 bp) 的标记。

2. 随机引物法

(1) 基本原理。该法是基于随机引物的应用、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段等的聚合酶活性及反应体系中含有一种或几种标记核苷酸等条件进行的。

所谓随机引物 (random primer) 是指含有各种可能排列顺序的寡核苷酸片段的混合物。由

于可与任意核酸序列杂交，因此随机引物可作为聚合酶反应的引物。

(2) 一般流程。将待标记的 DNA 双链变性后与随机引物一起杂交→以与待标记的 DNA 单链杂交的特异随机引物为引物，以待标记的 DNA 单链为模板，利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段的 5'→3' 聚合酶活性将 dNTP（其中一种或几种经过标记）顺序连接到切刻 3' 端的一 OH 上，以延伸合成新的 DNA 单链，从而形成标记的 DNA 探针。

(3) 主要特点。随机引物法是近年发展起来的一种较理想的核酸探针的标记方法。该法除了能进行双链 DNA 标记外，也适用于单链 DNA 和 RNA 探针的标记；探针标记活性高，可不经 Sephadex G-50 纯化而直接用于杂交；可直接在低熔点琼脂糖溶液中进行标记；该法操作简便，避免了切刻平移法中因 DNA 酶 I 处理浓度掌握不当所带来的问题；但由于该法标记的探针放射性活性相当高，而高放射性会造成核酸的破坏，因此用该法标记的核酸探针应及时使用。

3. 末端标记法

(1) 基本原理。该法是基于下述反应条件和下述酶活性进行的：大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段、T₄ DNA 聚合酶、T₄ 多核苷酸激酶或末端脱氧核苷酸转移酶等的活性以及反应体系中含有一种或几种标记核苷酸等。

(2) 主要特点。与切刻平移法和随机引物法不同，末端标记法并不对 DNA 片段进行全长标记，而只对其一端（5'端或 3'端）进行部分标记，即 DNA 片段并非均匀被标记，因此标记活性不高。

该法一般较少用于分子杂交探针的标记，而主要用于 DNA 序列测定等所需片段的标记。

(3) 几种末端标记法。

① 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段末端标记法：如前所述，大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段保留了大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 全酶的 5'→3' 聚合酶活性和 3'→5' 外切核酸酶活性，但失去了 5'→3' 外切核酸酶活性。因此可利用该酶进行双链 DNA 短缺 3' 端的填充标记。

该法主要用于 DNA 分子量参照物 (marker) 的标记。

② T₄ DNA 聚合酶末端标记法：T₄ DNA 聚合酶除了具有 5'→3' 聚合酶活性外，还具有较强的 3'→5' 外切核酸酶活性。当在反应体系中没有 dNTP 时，该酶主要表现 3'→5' 外切核酸酶的活性，因此就会形成 3' 端短缺的非平齐末端的双链 DNA。但在加入 dNTP 后，该酶 3'→5' 外切核酸酶活性被抑制而表现 5'→3' 聚合酶活性，从而就可进行双链 DNA 短缺 3' 端的填充标记。

该法主要用于小片段 DNA（尤其长度为几十至几百个核苷酸的小片段 DNA）的标记，以制备核酸分子杂交探针。

③ T₄ 多核苷酸激酶标记法：因为 T₄ 多核苷酸激酶能催化 ATP 分子上的 γ -磷酸基团转移到 DNA 或 RNA 分子的 5' 端的一 OH 上，所以在 γ -³²P-ATP 等存在时，该酶可对核酸分子（DNA 或 RNA，单链或双链）进行 5' 端标记。

根据反应条件，该酶可催化以下两种反应：A. 正向反应，核酸样品先经脱磷酸处理。该酶催化 γ -³²P-ATP 上的 γ -磷酸基团转移到核酸分子 5' 端的一 OH 上。B. 交换反应，核酸样品不经脱磷酸处理。该酶催化 γ -³²P-ATP 上的 γ -磷酸基团与核酸分子 5'-磷酸基团进行交换。不过，交换反应比正向反应的效率低。

该法主要用于核酸序列测定时的末端标记。

④末端脱氧核苷酸转移酶标记法：在辅助因子 Mg^{2+} 存在下，末端脱氧核苷酸转移酶催化 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dNTP}$ 在单链 DNA 的 3' 端多聚化；在辅助因子 Co^{2+} 存在下，其催化 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dNTP}$ 在双链 DNA 的 3' 端多聚化。

需要指出的是，该法由于不能控制在 DNA 分子 3' 端聚加核苷酸的数量，因此使得所标记的产物长度不一。

还要指出的是，生物素、地高辛等标记的 dNTP 完全可以像放射性同位素标记的 dNTP 一样，用多种酶促标记法（例如，切刻平移法、随机引物法、末端转移酶末端标记法等）进行核酸探针（包括 DNA、RNA 和寡核苷酸探针）的标记。具体操作方法与前述基本相同。

但要注意的是，由于生物素等标记物是连接在碱基而不是磷酸基团上，因此不能用多核苷酸激酶法进行末端标记。

（二）核酸分子的杂交

核酸分子杂交技术是基因工程及分子生物学领域中最常用的基本技术之一。

核酸分子杂交技术是基于在适宜的温度及离子强度等条件下，具有一定同源性的两条核酸单链可按碱基互补原则复性杂交形成双链的原理建立的。

杂交的两条核酸单链分别是核酸探针和待测核酸。

根据待测核酸的提取处理，一般可将核酸分子杂交主要分为核酸原位杂交、菌落原位杂交、斑点狭缝杂交和膜上吸印杂交等。

1. 核酸原位杂交

（1）基本原理。核酸原位杂交（nucleic acid hybridization in situ）是指以特定标记的已知序列核酸为探针与细胞内或组织切片内的待测核酸进行杂交并对其实行检测的方法。

根据所用探针与所测核酸种类，可将核酸原位杂交分为 DNA-DNA、DNA-RNA、RNA-RNA 杂交。

（2）一般流程。载片的处理（洗衣粉浸泡、酸浸、流水冲洗以保清洁，高温烘烤或高压灭菌以去除核酸酶污染，加涂多聚赖氨酸等组织细胞黏附剂以防后续处理导致组织细胞脱落）→组织细胞切片或涂片的固定→组织细胞杂交前的预处理→探针的标记（切刻平移法、随机引物法、末端标记法或化学标记法）→杂交液的配制→杂交（加含探针的杂交液 $10\sim 100\ \mu\text{L}$ 于载玻片上，再加硅化盖玻片于杂交液上，边缘用橡胶泥或石蜡封闭；将载片置密闭湿盒，在一定温度例如 50°C 的条件下，保温一定时间例如 $12\sim 14\text{h}$ ）→冲洗→放射自显影或免疫酶法显色显示杂交结果。

（3）注意要点。

①核酸原位杂交都在载片上进行，因此，在载片处理时，必须保持载片清洁，不能有任何核酸酶的污染。

②在进行核酸原位杂交时，组织细胞切片或涂片必须经过固定处理。在浸入固定液前，必须在空气中干燥至组织切片或细胞涂片表面没有水分。否则，组织细胞极易脱落。常用于核酸原位杂交的固定液有 10% 甲醛、4% 多聚甲醛、乙醇 + 冰醋酸（乙醇与冰醋酸的比为 3:1）、4% 戊二醛等。这些固定液各有优缺点，因此要根据具体试材，选择合适的固定液。

③在进行组织细胞杂交前预处理时，必须使用去污剂（Triton X-100、SDS）和/或蛋白酶

(蛋白酶 K) 对组织细胞进行部分酶解, 以去除核酸表面的蛋白质, 使探针在细胞基质中获得最大的穿透力而易于与靶核酸进行杂交。蛋白酶 K 等试剂中不能含有任何核酸酶。

④所用的核酸探针可以是双链 DNA、单链 DNA 或 RNA。细胞染色体 DNA 体外杂交常用较长的探针以增强杂交信号。相反, 细胞原位核酸杂交则常用较短的探针, 通常为 50~300 bp。小分子探针的穿透力较大分子探针的穿透力强。但大分子探针可在组织细胞中形成网络而增加杂交信号, 同时也使本底增高。

2. 菌落原位杂交

(1) 基本原理。菌落原位杂交是指首先将生长在培养基平板上的菌落按照其原来的位置不变地转移到滤膜上, 然后在滤膜上进行原位溶菌、DNA 变性、杂交, 并实行检测的方法。

(2) 一般流程。将转化菌影印到铺放在琼脂平板表面的硝酸纤维素滤膜上进行培养, 同时保存该母板→取出长有菌落的硝酸纤维素滤膜, 用碱性溶液处理, 使细胞破裂、DNA 变性→由于变性 DNA 同硝酸纤维素滤膜有很强的亲和力, 因此 DNA 结合在滤膜上。在 80℃ 烘烤滤膜, 使 DNA 牢固地固定下来(此带有 DNA 印迹的滤膜可长期保存)→以放射性同位素等标记的 DNA 或 RNA 为探针, 与滤膜上菌落所释放的变性 DNA 杂交→用放射自显影技术进行检测, 凡是含有与探针互补序列的菌落 DNA 都会在 X 光胶片上出现曝光点→根据曝光点的位置, 从保存母板上的相应位置挑出所需的阳性菌落。

3. 斑点狭缝杂交

(1) 基本原理。斑点狭缝杂交(dot and slot blotting)是指将 RNA 或 DNA 变性后直接以形成斑点或狭缝的装置点样于硝酸纤维素滤膜上, 与标记的核酸探针进行杂交并对其实行检测的方法。

(2) 一般流程(手工点样斑点杂交)。制备核酸样品→将核酸样品进行变性处理→利用微量加样器直接点样于干燥的硝酸纤维素滤膜上→与标记的核酸探针进行杂交→放射自显影或免疫酶法显色显示杂交结果。

(3) 主要特点。

①该法简单、迅速, 可在一张膜上同时进行多个样品的检测; 对于核酸粗提样品的检测效果也较好。

②不能鉴定所测基因的分子量, 特异性不高, 有一定比例的假阳性。

4. 膜上吸印杂交 其是目前最常用的一种核酸分子杂交方法。

(1) 基本原理。膜上吸印杂交是指将待测核酸序列片段通过吸印技术转移结合到一定的固相支持物上, 然后与存在于液相中标记的核酸探针进行杂交并对其实行检测的方法。

(2) 固相支持物。

①硝酸纤维素滤膜(nitrocellulose filter membrane): 具有较强的吸附单链 DNA 和 RNA 的能力; 杂交信号本底较低; 非特异性吸附蛋白质的作用较弱。但是, 与 DNA 的结合不很牢固(尤其在高温情况下), DNA 易解离脱落。因此不太适于在同一膜上重复进行杂交; 其质地较脆(尤其经烘烤后), 操作不方便; 与核酸的结合依赖于高盐浓度, 因此不适于电泳转移吸印; 对小分子量 DNA 片段(尤为小于 200 bp 的 DNA 片段)结合能力不强。

②尼龙膜(nylon membrane): 具有更强吸附单链和双链 DNA 和 RNA 的能力; 烘烤、紫外

线照射、微波处理或碱处理等均可使核酸分子牢固地结合于尼龙膜上；韧性较强，操作较方便；对于小分子量的核酸片段（甚至短至 10 bp）也有较强的结合能力；在低离子强度条件下也可较好地结合 DNA，因此比较适于电泳转移吸印；其可重复用于杂交。但是，其杂交信号本底较高。不过，可用加大预杂交液中非特异性封闭试剂的方法加以克服。

(3) 吸印方法。根据转移的作用方式，一般可将吸印方法主要分为利用毛细管虹吸作用的虹吸转移法、利用电场作用电泳转移法和利用真空抽滤作用的真空转移法。

①虹吸转移法：该法一般适于 DNA 片段长度为 0.5~10 kb 的转移。DNA 片段的长度决定了其转移的速度。

②电泳转移法：该法尤其适于转移用毛细管虹吸转移法不理想的大片段 DNA。

需要指出的是，电泳转移法不能选用硝酸纤维素滤膜作为固相支持物。因为硝酸纤维素滤膜结合 DNA 依赖于高浓度盐溶液，而高浓度盐溶液的导电性极强，会产生强大的电流使转移体系的温度急剧升高，破坏缓冲体系，从而使 DNA 受到破坏。可选用正电荷修饰的尼龙膜作为固相支持物。此外，务必注意降低转移体系的温度，可采用循环冷却水降温或在冷室中进行转移。

③真空转移法：该法的最大优点是迅速，可在转膜的同时进行 DNA 的变性与中和。

需要指出的是，虹吸转移法、电泳转移法、真空转移法等均可用于 RNA 的转移。

(4) 核酸膜上吸印杂交的主要类型。根据核酸的种类，一般可将膜上吸印杂交主要分为涉及 DNA 吸印的 Southern 吸印杂交法和涉及 RNA 吸印的 Northern 吸印杂交法。

①Southern 吸印杂交法：

A. 基本原理，Southern 吸印杂交法 (Southern blot) 是指通过虹吸转移法、电泳转移法、真空转移法等转移方法将经电泳分离及变性的 DNA 片段转移到一定固相支持物上然后进行杂交并对其实行检测的方法。

B. 一般流程，用适当的限制性内切核酸酶对待测 DNA 进行酶切→经琼脂糖凝胶电泳将所得 DNA 片段按分子量大小分离→将含有 DNA 片段的琼脂糖凝胶进行碱变性处理→将其中的单链 DNA 片段转移到硝酸纤维素滤膜或其他固相支持物上（各 DNA 片段的相对位置保持不变）→与标记的核酸探针进行杂交→放射自显影或免疫酶法显色显示杂交结果。

C. 注意要点，a. 所取待测 DNA 样品的量因样品种类及研究目的而异。对于克隆片段的限制性内切酶图谱分析，取 0.1~0.5 μg ；对于鉴定基因组 DNA 中的单拷贝基因序列，取 10~20 μg ；对于采用寡核苷酸探针或当探针的比放射活性较低时，取 30~50 μg 。b. 选用适当的限制性内切核酸酶酶切待测 DNA 样品的目的在于获得合适长度的 DNA 片段。一般而言，较理想的片段长度为 0.5~10 kb。c. 电泳结束后，需在紫外线下仔细观察检查 DNA 样品有无降解；酶切是否完全；电泳分离效果是否理想；DNA 电泳带型是否清晰，有无拖尾等现象。d. 一般采用 0.45 μm 孔径的硝酸纤维素滤膜。但当 DNA 片段小于 300 bp 时，可选用 0.22 μm 孔径的硝酸纤维素滤膜，或采用尼龙膜。

②Northern 吸印杂交法：

A. 基本原理，Northern 吸印杂交法 (Northern blot) 是指通过虹吸转移法、电泳转移法、真空转移法等转移方法将经变性及电泳分离的 RNA 转移到一定固相支持物上，然后进行杂交并

对其实行检测的方法。

B. 一般流程, 与 Southern 吸印杂交法基本相同。但 Northern 吸印杂交法主要用于鉴定特定 mRNA 分子的大小及多少。此外, RNA 的变性方法与 DNA 的变性方法不同。RNA 不能用碱变性, 因为碱会导致 RNA 的水解。常用的 RNA 变性电泳方法有甲醛变性胶电泳、聚乙二醛和二甲基亚砷变性电泳、甲基氢氧化汞电泳等。

C. 注意要点, a. RNA 极易被内源和外源的 RNA 酶所降解, 因此必须特别注意避免 RNA 酶的污染。b. 尼龙膜可在碱性条件下与 RNA 结合, 因此可用 7.5 mmol/L 的 NaOH 作为转移液。在此碱性条件下转移的优点在于可将 RNA 部分降解, 从而提高转移效率; 同时, RNA 可与尼龙膜不可逆地结合, 因此转移后不必经烘烤或用紫外线照射固定。

(三) 多聚酶链式反应

1. 基本原理 多聚酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术是指在模板 DNA、引物和 4 种脱氧核糖核苷酸存在的条件下, 利用 DNA 聚合酶催化合成反应, 体外扩增特异 DNA 片段的技术。

在进行 PCR 扩增时, 通常需要设计合成一对 (两个) 与目的 DNA 片段两侧翼序列分别互补的寡核苷酸引物。其中一引物与目的区段上游一条模板链的序列相互补, 而另一引物与目的区段下游另一条模板链的序列相互补。将热变性后分开的两条模板链与摩尔数大为过量的两个引物共同温育复性产生的模板-引物杂交体作为作用底物, 利用耐热的 Taq DNA 聚合酶催化延伸合成反应。在第一轮扩增完毕后, 将反应混合物再加热使新构成的双链 DNA 变性, 然后再度温育使模板链与引物复性, 进入第二轮特异性合成。由于耐热的 Taq DNA 聚合酶在热变性步骤中不失活, 因此可直接进入第二轮特异性合成而不需要另外补加 DNA 聚合酶等。如此变性、复性、延伸合成周而复始地循环进行, 使两引物所限定区间的目的 DNA 片段得到指数式扩增。

如上所述, PCR 的每个循环包括 3 步: ①变性 (denaturation), 通过加热至一定温度使双链 DNA 两链间的氢键断裂, DNA 双链离解形成两条 DNA 单链。②复性 (退火, annealing), 当反应体系温度突然降低时, 由于模板 DNA 分子的结构比引物 DNA 分子复杂得多, 而且在反应体系中引物的量大大多于模板, 因此引物和其互补的模板配对形成局部杂交双链, 而变性后离解形成的两条模板 DNA 单链之间互补配对的机会则较少。③延伸 (extension), 在 4 种脱氧核糖核苷三磷酸底物、 Mg^{2+} 等存在的条件下, Taq DNA 聚合酶以模板-引物杂交体分别为模板和引物催化 DNA 链沿 5'→3' 方向合成延伸。每个循环的扩增产物作为下一循环的模板。

2. PCR 的反应体系及反应条件

(1) 反应体系。PCR 反应体系一般选用 50~100 μ L 体积, 其中含有下列反应成分:

- ① KCl 50 mmol/L。
- ② Tris-Cl 10 mmol/L (在室温时 pH 8.4)。
- ③ $MgCl_2$ 1.5 mmol/L。
- ④ 明胶或牛血清白蛋白 100 μ g/mL。
- ⑤ 2 个引物, 各 0.25 μ mol/L。
- ⑥ 4 种底物 (dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP), 各 200 μ mol/L。
- ⑦ 模板 DNA 0.1 μ g。

⑧Taq DNA 聚合酶 2.5 IU。

为防高温反应时液体的挥发，可封上矿物油。这样，即可进行 PCR。

(2) 反应条件。PCR 反应条件一般如下：94℃ 变性 30s；55℃ 复性 30s；70~72℃ 延伸 30~60s。一共进行 30 轮左右的循环。

需要指出的是，由于 Taq DNA 聚合酶作用时需要 Mg^{2+} ，模板-引物杂交体的变性解链和复性等均受 2 价阳离子的影响，因此必须确定每次扩增反应的最佳 Mg^{2+} 浓度。同时，由于磷酸盐缓冲液抑制 Taq DNA 聚合酶的活性，因此务必不能使用该缓冲液。

3. 注意要点

(1) 50 mmol/L 的 KCl 能促进引物复性。但是如果高于此浓度，就会抑制 Taq DNA 聚合酶的活性。

(2) 10~50 mmol/L 的 Tris-Cl 可调节反应体系的 pH 值，维持反应体系处于 Taq DNA 聚合酶作用所需的偏碱性环境。

(3) 1.5~2.0 mmol/L 的 Mg^{2+} 是比较合适的（相应 dNTP 的浓度为 200 μ mol/L）。一般而言， Mg^{2+} 至少应比 dNTP 总浓度高 0.5~1.0 mmol/L。但是，过量的 Mg^{2+} 会增加非特异性扩增及影响产率。

(4) 明胶或牛血清白蛋白对酶有一定的保护作用。但是如果质量不高，就会起相反作用。

(5) 引物的使用浓度常为 0.1~0.5 μ mol/L。如果引物浓度过高，那么会引起错配和非特异性扩增，且可增加引物之间形成二聚体的可能，从而竞争使用酶、底物和引物等，使得 DNA 合成产率降低。

(6) 由于 dNTP 溶液具有较强的酸性，因此在使用时需以 NaOH 将其 pH 调至 7.0~7.5，再分装于小管，置 -20℃ 贮存。过多的冻融会使 dNTP 产生降解。dNTP 的使用浓度应在 20~200 μ mol/L，其浓度过高可加快反应速度，但是同时也会增加碱基的错误掺入率及实验成本；反之，其浓度过低会减慢反应速度，但是同时也会提高实验的精确性。4 种底物（dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP）的使用浓度必须等当量，以减少错配误差和提高使用效率。此外，由于 dNTP 可与 Mg^{2+} 结合，因此应注意 Mg^{2+} 浓度与 dNTP 浓度之间的关系。

(7) 模板 DNA 的加入量须根据其分子量的大小加以调整，一般需含 $10^2 \sim 10^5$ 拷贝。

(8) 在 100 μ L 反应体系中，一般所需 Taq DNA 聚合酶 0.5~5 IU，具体视待扩增 DNA 片段的长度及其复杂程度（G+C 含量）而定，同时应注意不同生产厂家酶的定义及生产条件。Taq DNA 聚合酶使用浓度过高，可引起非特异性产物的扩增；Taq DNA 聚合酶使用浓度过低，会使合成产物量减少。

需要指出的是，在使用 Taq DNA 聚合酶的 PCR 中，出现碱基错配的几率一般为 2.1×10^{-4} 左右。现从海底火山口分离到的一种能在近 100℃ 高温下生长的 *Thermococcus litoralis* 菌中提纯到了一种性能比 Taq DNA 聚合酶更优越的耐热酶：VentTM DNA 聚合酶。该酶在 100℃ 时半衰期达 95min，且还具有 3'→5' 外切核酸酶活性。这一活性可能会有效地降低碱基的错配率。

(9) 94℃ 变性 30s 一般可使各种复杂的 DNA 分子完全变性。温度过高及高温持续时间过长会使 Taq DNA 聚合酶和 dNTP 分子等受损。

(10) 复性温度的选择可以根据引物的长度及其 G+C 的含量确定。当长度在 15~25 bp 之间

时,引物的复性温度可以通过 $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$ 计算得到。在 T_m 允许的范围内,选择较高的复性温度,可以大大减少引物和模板之间的非特异性结合,提高 PCR 的特异性。复性时间 30s 足以使引物和模板之间完全结合。

(11) 延伸温度选择在 70~75℃ 之间,此时, Taq DNA 聚合酶具有最高活性。延伸时间可以根据待扩增 DNA 片段的长度而定。一般而言,短于 1 kb 片段的延伸时间 1min 足够;长于 1 kb 片段的延伸时间需要相应延长。例如,扩增 10 kb 片段的延伸时间可达 15min。

(12) 反应循环次数主要取决于模板 DNA 的浓度。一般而言,反应循环次数为 30 次左右。反应循环次数愈多,非特异性扩增产物的量增加愈多。

4. PCR 引物的设计的一般原则

(1) 长度可为 15~30 bp, 常为 20~27 bp。

(2) G+C 含量一般可为 40%~60%, 常为 45%~55%。

(3) 组成碱基尽可能随机分布,不能存在聚嘌呤或者聚嘧啶。尤其 3' 端不能以 3 个连续 G 或者 3 个连续 C 结束。否则,会使引物在模板 G+C 富集区错误引发。

(4) 引物自身不能存在互补序列,连续互补碱基不能超过 3 个。否则,引物自身会折叠形成发夹状等二级结构,这些二级结构的空位阻作用影响引物与模板的复性结合。

(5) 两个引物之间不能有互补性,尤其 3' 端不能存在互补性。否则,会形成引物二聚体。两个引物之间不能超过 4 个连续碱基的同源性或者互补性。

(6) 引物 3' 端原则上须与模板 DNA 配对。当引物 3' 端末位碱基为 A 时,即使在错配的情况下,也能较好引发链的延伸。而当引物 3' 端末位碱基为 T 时,如果为错配之碱基,其引发链延伸的效率就大大降低。当引物 3' 端末位碱基为 G 或 C 时,如果为错配之碱基,其引发链延伸的效率就介于上述两者之间。因此,引物 3' 端的末位碱基最好选 T、C 或 G,不选 A。

(7) 由于引物 5' 端只限定 PCR 产物的长度,而不影响扩增的特异性,因此引物 5' 端可被修饰。引物的 5' 端修饰包括附加酶切位点,引入蛋白质结合序列、突变位点、启动子、生物素等。总之,引物 5' 端碱基没有严格限制,只要与模板 DNA 结合的引物部分的长度足够,其 5' 端碱基可以不与模板 DNA 匹配而呈游离状态。例如,在引物 5' 端可以游离多达数十个碱基而不影响 PCR 的进行。

(8) 如果需要扩增编码区域,引物 3' 端就不要终止于密码子的第三位,因为密码子的第三位易出现简并现象,从而影响扩增的特异性与效率。

(9) 引物的序列与模板的非扩增区序列之间的同源性不要超过 70% 或者不要有连续 8 个碱基互补同源。

5. 引物的 5' 端修饰 如上所述,PCR 的延伸从两个引物的 3' 端开始,并决定着 PCR 产物的特异性。而 5' 端则限定着 PCR 产物的长度。对引物 5' 端进行修饰非但不影响正常的 PCR,反而有助于对 PCR 产物的分析及进一步的操作。

根据具体修饰方法,一般可将引物 5' 端修饰分为附加核酸序列和功能基团修饰。

附加核酸序列法包括附加酶切位点、启动子、蛋白质结合序列、核糖体结合位点、突变位点等。

功能基团修饰法是指引入功能基团修饰引物 5' 端,主要包括两类:放射性同位素(修饰三

磷酸)和非放射性分子(修饰碱基)。

根据对 PCR 产物的要求,可以选择相应的引物 5'端修饰。在附加核酸序列时,根据不同的研究目的,可在引物 5'端附加长达 45 个碱基而不影响 PCR 的进行。附加核酸序列的方法很简单,一般只需在设计合成引物时,在 5'端加上所需序列。但是在设计附加酶切位点时,一般需在酶切位点的 5'端再设计附加 2~4 个无关碱基,以确保 PCR 扩增产物的酶切效果。

6. 未知序列的扩增 PCR 最初是为扩增已知序列 DNA 而发明设计的,PCR 技术的发展使得一些未知序列的扩增成为可能。用于未知序列扩增的特殊 PCR 方法主要如下:

(1) 锚定 PCR (anchored PCR, A-PCR)。如果需要扩增克隆一段已知序列 5'端上游邻近的未知 cDNA 序列,首先要分离细胞总 RNA 或 mRNA,根据已知序列设计合成特异引物,在逆转录酶的作用下合成 cDNA 第一链,然后利用 DNA 末端转移酶在 cDNA 第一链的 3'端加上 poly (dG) 尾,人工合成带有合适酶切位点及与 poly (dG) 相对应的 poly (dC) 的锚定引物。为保证扩增特异性,poly (dC) 至少应在十二聚以上。最后,利用特异引物和锚定引物进行 PCR 扩增,即可获得一段已知序列 5'端上游邻近的未知 cDNA 序列的克隆。

经过适当修改,也可扩增克隆一段已知序列 3'端下游邻近的未知 cDNA 序列。

另外,当已知某蛋白质 N 端或 C 端部分氨基酸序列时,经过适当修改,该法还可用于从基因组 DNA 扩增克隆该蛋白质的编码基因。

(2) 简并引物 PCR (degenerate primer PCR, DP-PCR)。所谓简并引物是指碱基序列不同,但有相同碱基数的一组针对某一基因相同区段的寡核苷酸混合物。

值得指出的是,由于次黄嘌呤可与任何碱基配对,因此在碱基高度简并位置可使用次黄嘌呤替代。

简并引物 PCR 是指利用简并引物进行 PCR 的方法。该法主要用于仅知蛋白质部分序列而求知其编码基因序列的研究、寻找已知基因家族中新成员的研究等。

(3) 反向 PCR (inverse PCR, I-PCR)。将含已知序列区段的 DNA 分子,用在已知序列区段内没有切点的合适的限制性内切核酸酶酶解,产生大小适于 PCR 扩增的酶切片段。将这些酶切片段的两端连接起来形成环状分子,用一对与已知序列区段两侧互补的引物进行 PCR。对已知序列区段而言,在引物与模板复性后,两引物的 3'端相背,两引物的延伸沿环状分子的未知序列区段进行。

该法可对已知序列 DNA 片段两侧的未知序列进行扩增。

(4) 单一特异引物 PCR (single specific primer PCR, SSP-PCR)。用合适的限制性内切核酸酶酶切基因组 DNA,将酶切片段与合适载体连接重组。利用特异引物(与特异酶切片段一端互补)和通用引物(与载体特异互补)来扩增特异酶切片段。

与反向 PCR 相比,该法不需环化酶切片段。反向 PCR 的扩增产物是已知序列 DNA 片段两侧的未知序列,不是连续的;而该法的扩增产物是连续的。该法可用于内含子-外显子的接头分析。

(5) 臆断引物 PCR (arbitrary primer PCR, AP-PCR)。在温度等不严格的反应条件下,将臆断选择的一个非特异引物与待分析的模板 DNA 通过错配而复性。如果该非特异引物能作为两个反向引物与模板 DNA 双链相距一定距离复性,那么经过 PCR,两两反向引物所限定的 DNA 片

段就会得到高效扩增。通过对扩增产物的凝胶电泳分离，最后可以获得反映待分析基因组特征的指纹图。

该法可以用于鉴定生物种间多态性等研究。

7. 其他常用的 PCR 技术

(1) 逆转录 PCR (reverse transcribed PCR, RT-PCR)。以总 RNA 或 mRNA 为模板进行逆转录，然后再进行 PCR 扩增。该法主要用于基因表达等研究。

(2) 不对称 PCR (asymmetric PCR)。在 PCR 反应体系中，加入高、低两种不同浓度的非限制性和限制性两种引物进行特异扩增，从而得到大量单链 DNA。非限制性和限制性两种引物的浓度的比值一般采用 50~100:1。关键是低浓度引物（即限制性引物）的绝对量。限制性引物太多太少均不利于制备单链 DNA。在低浓度引物被消耗完之前的扩增循环中，主要产物还是双链 DNA。但是当低浓度引物被消耗完之后的扩增循环中，高浓度引物引导的 PCR 反应就会产生大量单链 DNA。

该法主要用于为测定核苷酸序列制备单链 DNA 模板。

(3) 多重 PCR (multiplex PCR)。在同一试管中加入多对引物，扩增同一模板 DNA 的几个区段。该法主要用于检测大基因上可能发生的多处缺失等突变。

(4) 巢式 PCR (nested PCR)。首先以第一对引物对模板进行扩增，即扩增靶基因中较大区域片段 DNA，然后再以较大区域内的序列设计合成第二对引物。再对模板进行 PCR 扩增，即扩增靶基因中较小区域片段 DNA。

该法两次连续扩增模板靶基因，可进一步提高 PCR 检测的灵敏度和特异性。该法特别适于微量模板的扩增。

8. PCR 扩增中的常见问题、可能原因及解决办法

(1) 没有扩增产物的可能原因及解决办法。

① 酶失活或未加酶：换新酶或加入酶。

② 模板样品含有杂质：再行纯化。

③ 模板变性不彻底，解链不完全：提高校准变性温度或延长变性时间。

④ 反应体系中有蛋白酶或核酸酶污染：在加 Taq DNA 聚合酶之前，将反应体系于 95℃ 加热 10min。

⑤ 引物存在问题：重新设计引物，纯化引物。

⑥ 试剂没有混匀：严格操作规范，充分混匀反应体系。

(2) 扩增产物在电泳凝胶上呈涂布或片状的可能原因及解决办法。

① 加酶太多或者酶质量差：减少酶量或者换用优质的酶制剂。

② 模板降解：重新提取制备模板。

③ dNTP 浓度太高：降低 dNTP 浓度。

④ Mg^{2+} 浓度太高：适当降低 Mg^{2+} 浓度。

⑤ 复性温度太低：提高复性温度。

⑥ 延伸时间太长：缩短延伸时间。

⑦ 循环次数太多：适当增加模板用量，减少循环次数。

⑧电泳体系存在问题：调整凝胶中缓冲液与电泳缓冲液的浓度，制备好凝胶，选用优质琼脂糖。

(3) 溴酚蓝前有很宽区带的可能原因及解决办法。

①模板量太低：提高模板量。

②引物 3'端互补：重新设计合成引物。

③引物用量太多：减少引物用量。

④预变性后没有立即进行扩增：预变性后立即进行扩增。

⑤复性温度太低，复性时间太长：提高复性温度，缩短复性时间。

⑥循环次数太多：减少循环次数。

(4) 扩增产物出现多带的可能原因及解决办法。

①加酶太多：减少酶量。

②引物用量太多，引物特异性不够高：减少引物用量，重新设计合成引物。

③ Mg^{2+} 浓度太高：适当降低 Mg^{2+} 浓度。

④复性温度太低，延伸时间太长：提高复性温度，缩短延伸时间。

⑤循环次数太多：适当增加模板用量，减少循环次数。

(5) PCR 假阳性结果的可能原因及解决办法。

①靶序列的交叉污染：重新制备核酸样品，严格避免交叉污染。

②引物设计不当：重新设计合成引物。

③循环参数不当：调整循环参数，避免非特异性扩增。

(6) PCR 假阴性结果的可能原因及解决办法。

①样品含有酶抑制剂：进一步纯化或重新制备样品。

②引物太短：重新设计合成更长引物。

③试剂浓度不准：重新配制正确浓度试剂。

④循环参数不当：调整循环参数。

第二节 基因工程研究

一、目的基因的分离与制备

基因工程研究的第一步就是分离与制备目的基因。

(一) 目的基因的分离

1. 基因分离的策略 在完全未知基因核苷酸序列的情况下，基因的分离策略大多比较复杂。一般分离基因的策略多基于基因以下几个基本特性中的至少一个：①具有特定的核苷酸序列；②存在于基因组中某一特定位置；③编码 mRNA；④大多具有一定的功能。

2. 基因分离的注意事项 具体在进行目的基因分离时，注意要点如下。

(1) 目前，应用广泛的是以基因表达产物蛋白质的纯化或表型突变体的分离为基础的基因分离策略。但是，采用该策略的主要限制因素如下：大多数基因的表达产物仍属未知；有时即使已

知,也还不能纯化足够的蛋白质供氨基酸测序或抗体制备。

(2) 可通过植物细胞工程、物理和/或化学诱变等技术,从离体培养的细胞中筛选突变体,进而根据基因突变互补性分离相应植物基因。

(3) 可在 cDNA 文库中随机取一个克隆,测定其 5' 端的部分序列(约 500 bp),并将所测序列所编码的可能被翻译蛋白质的氨基酸序列与数据库中已知蛋白质的氨基酸序列做比较,从而推断出这个克隆所含基因的可能功能。

(4) 可通过建立能表达反义 mRNA 的转基因植株以鉴定某一基因的功能。该策略的要点就是将某一感兴趣的基因序列通过克隆 cDNA、利用反义技术进行构建,将其置于某一强启动子下游,再将其导入受体植物。因为反义 mRNA 能与受体植物中的靶 mRNA 配对结合,减少了具有翻译功能靶 mRNA 的量,所以降低或阻止了该基因表达产物蛋白质的生成。

所谓反义技术是指根据碱基互补原理,以人工化学合成或从生物体中分离制备的特定互补的 DNA 或 RNA 片段(或其化学修饰产物),抑制或封闭靶基因表达的技术。

(5) 理论上,只要突变的基因被鉴定和定位,采用染色体步移(chromosomal walking)等方法就可将这个基因分离出来。利用 RFLP(restriction fragment length polymorphism)、RAPD(random amplified polymorphic DNA)、AFLP(amplified fragment length polymorphism)等分子标记方法将某一基因进行相对准确的定位;然后以包含所感兴趣染色体上下游的两个紧密连锁标记为探针,分离这个片段;最后根据遗传突变互补性鉴定并分离这个基因。

(6) 许多植物基因可以根据其与细菌和酵母突变互补能力来分离。利用微生物与高等植物基因功能的互补特点来分离有关的植物基因是极其有效的。

(7) 许多有潜在利用价值的植物基因(包括控制一些重要的植物次生代谢产物的基因)都是在特定植物组织中表达的(具有组织特异性)。富集这些基因的方法多采用差别筛选法(differential screening),也即从种植在不同条件下的相同植物,或从不同发育时期的相同植物,或从相同植物的不同组织等样品中提取 mRNA,然后由其制备带标记的 cDNA,再以其作探针对适当生物的 DNA 文库进行鉴定。这样,根据 DNA 标记的强弱就可确定某一基因在不同样品中的表达差异。该法对鉴定高效表达的基因有效。但利用 PCR 技术扩增稀有 cDNA 克隆,可以鉴定具特异性表达但表达能力弱的基因。

但是,许多基因具有相似的特异表达模式,限制了特定基因的鉴定工作。结合其他筛选方法,例如建立表达反义 mRNA 的转基因植株等,可克服上述困难。

(8) 除了上述策略外,还有其他一些分离基因的策略,例如以 DNA 插入诱变为前提的分离基因的策略等。

(二) 目的基因的制备

在已知基因部分核苷酸序列或全部核苷酸序列的情况下,基因的制备方法主要可分为两大类:一类是基因化学合成法,一类是基因生物制备法。一般又可将基因生物制备法分为基因组文库法、cDNA 文库法和 PCR 法等。

1. 基因化学合成法 就化学本质而言,基因是一段具有特定生物功能的核苷酸序列。如果知道了基因的分子结构,就可以进行基因的化学合成。

迄今,有关 DNA 的化学合成方法主要有磷酸二酯法、磷酸三酯法、亚磷酸三酯法、亚磷酸

酰胺法及固相亚磷酸酰胺法。磷酸二酯法是最初发明的化学合成基因的方法，而固相亚磷酸酰胺法是目前绝大部分 DNA 自动合成仪所使用的方法。

由于现代科学技术的发展，DNA 的化学合成已经广泛采用 DNA 自动合成仪进行，因此现在仅在少数特殊情况下，采用人工合成。

目前，化学合成基因的思路主要有两条：①全基因合成，其一般适于分子较小而不易获得的基因。首先根据双链基因序列，合成长度为 40~60 个碱基的寡核苷酸单链片段，并使每对相邻互补的片段之间有 4~6 个碱基交叉重叠，然后将除基因两个末端外的所有片段磷酸化，在混合复性后加入 DNA 连接酶，即可获得较大的基因片段。如果需连接的 DNA 片段较多，可采用分步连接及克隆的方法，最后将克隆的较大片段重组为完整的基因。②基因的半合成，其一般适于分子较大的基因。首先合成末端间有 10~14 个互补碱基的寡核苷酸单链片段，复性后以重叠区为引物，利用 DNA 聚合酶 I 大片段或逆转录酶等催化合成反应，即可获得两条完整的互补双链 DNA。

基因的化学合成法主要用于 PCR 扩增引物、核酸测序引物、核酸杂交探针和合成接头等寡核苷酸片段的合成。

2. 基因组文库法 基因组文库法是一种直接从基因组中分离目的基因的方法。所谓基因组文库 (gene library 或 gene bank)，是指汇集某一基因组所有 DNA 序列的重组 DNA 群体。

高等真核生物染色体基因组文库通常是以 λ 噬菌体作为载体构建的，有时也可以柯斯质粒作为载体构建。

利用 λ 噬菌体载体构建基因组文库的一般操作程序如下：①选用识别序列均为 4 个核苷酸的两种限制性内切核酸酶，对从某一高等真核生物组织细胞中提取的染色体基因组 DNA 进行部分酶解，得到 10~30 kb 的 DNA 限制性片段，利用凝胶电泳法等从中分离出大小为 20 kb 左右的随机片段群体。②选用适当限制性内切核酸酶酶解 λ 噬菌体载体 DNA。③经适当处理，将基因组 DNA 限制性片段与 λ 噬菌体载体进行体外重组。④利用体外包装系统将重组体包装成完整的颗粒。⑤以重组噬菌体颗粒侵染大肠杆菌，形成大量噬菌斑，从而形成含有整个基因组 DNA 的重组 DNA 克隆群体，即基因组文库。

具备了基因组文库，就可以适当的目的基因片段作探针，利用高密度的噬菌斑或菌落原位杂交技术，从大量的噬菌斑或菌落中筛选出含有目的基因的重组体的噬菌斑或菌落，再经过扩增，提取其中的重组体，最后即可获得所需要的目的基因片段。

3. cDNA 文库法 虽然可用基因组文库法来获取真核生物的目的基因，但是由于高等真核生物基因组 DNA 文库比其 cDNA 文库大得多，相关工作量同样大得多。更为重要的是，在真核生物基因组中含有大量的间隔序列 (intron)，但在大肠杆菌等原核生物中尚未发现类似序列的存在，大肠杆菌不能从真核生物基因的初级转录本中去除间隔序列，即不能表达真核生物基因组 DNA。而在真核生物成熟 mRNA 中已不存在间隔序列 (其已在拼接过程中被去除)，以真核生物成熟 mRNA 为模板逆转录而成的 cDNA 可被大肠杆菌表达。因此，在基因工程中，cDNA 文库法是从真核生物细胞中分离目的基因的常用方法。

所谓 cDNA 文库 (cDNA library) 是指汇集以某生物成熟 mRNA 为模板逆转录而成的 cDNA 序列的重组 DNA 群体。

cDNA 文库通常以 λ 噬菌体和质粒作为载体构建。

构建 cDNA 文库的一般操作程序如下：

(1) 总 RNA 的提取。从细胞中提取 RNA 与提取 DNA 的方法基本相同。但是，由于 RNA 酶不易失活，因此在分离 RNA 时，抑制 RNA 酶的活性特别重要。常用的 RNA 酶的抑制剂有异硫氰酸胍、盐酸胍、二乙基焦碳酸 (DEPC) 等。

(2) mRNA 的分离。真核细胞 mRNA 一般为其总 RNA 的 1%~5%，每种特异 mRNA 的量非常少。因此，要提取特异 mRNA，就需要选择特异而高度分化的组织。在这些组织细胞中特异 mRNA 所占的比例较大。真核细胞 mRNA 的 3' 端一般带有 poly (A) 序列，这一重要特性常被用于从总 RNA 中分离带 poly (A) 的 mRNA。

(3) cDNA 双链的合成。以 poly (A) RNA 为模板，以 oligo (dT) 作引物，加入 4 种三磷酸脱氧核苷 (dNTP)，在逆转录酶的作用下合成 cDNA 第一链，在链的末端弯回形成一发夹结构；碱处理降解 RNA 与 DNA 杂交双链中的 RNA 模板链；以 cDNA 第一链为模板，发夹结构为引物，在逆转录酶或 DNA 聚合酶 I (或其 Klenow 片段) 作用下，利用 4 种三磷酸脱氧核苷 (dNTP)，合成 cDNA 第二链；用特异切除单链的 S_1 酶切去发夹环部分，最终得到平端双链 cDNA。

需要指出的是，逆转录能否形成全长 cDNA，取决于转录中所取的条件、模板的结构和纯度。为了获得全长 cDNA，并提高其在总 cDNA 中的比例，需要注意：提高底物 dNTP 的浓度，或加入一定量的焦磷酸钠等；加入氢氧化甲基汞或解链蛋白以打开 mRNA 的二级结构，使逆转录酶易于穿越 mRNA 的特异性区域；加入 RNase 抑制剂，以防止污染的 RNase 对模板的降解作用；在合成 cDNA 第二链时，采用无 5'→3' 外切核酸酶活性的大肠杆菌聚合酶 I 的 Klenow 片段，而不是全酶。

(4) cDNA 与载体的连接。

(5) 噬菌体的包装及转染或质粒的转化，形成大量噬菌斑或菌落，从而形成以某生物成熟 mRNA 为模板逆转录而成的 cDNA 序列的重组 DNA 群体，即 cDNA 文库。

同样，具备了 cDNA 文库，就可以适当的基因片段作探针，利用高密度的噬菌斑或菌落原位杂交技术，从大量的噬菌斑或菌落中筛选出含有目的基因的重组体的噬菌斑或菌落，再经过扩增，提取其中的重组体，最后即可获得所需要的目的基因片段。

4. PCR 法 如上所述，一般经典的 PCR 法可用于已知核苷酸序列核酸片段的特异扩增；而一些改进的 PCR 法可用于一些未知核苷酸序列核酸片段的特异扩增。在此，不再赘述。

二、目的基因与载体的重组 (重组体的构建)

(一) 质粒 DNA 的分离纯化

一般含有单独目的基因的 DNA 片段即使进入了宿主细胞也不能进行增殖。通常它需要同适当的能自我复制的 DNA 分子 (例如质粒、噬菌体 DNA 等) 结合后才能通过转化或其他途径导入宿主细胞，像正常质粒或病毒一样增殖和易于检测。

分离质粒载体 DNA 有许多方法，但其共同步骤是先用溶菌酶处理含有质粒载体的宿主菌培

养物，以除去其细胞壁，然后加入去污剂（例如 SDS），使其发生温和的溶菌作用。这样质粒 DNA、多聚核糖体、可溶性蛋白质、tRNA 等细胞内的大分子物质便逐步地释放出来，而核染色体的 DNA 则仍然附着在细胞的残渣碎片上，经过离心处理可使其同质粒分开。

将离心所得的含有质粒 DNA 的上清液加酚处理除去蛋白。剩下的 DNA 混合物中，质粒 DNA (cccDNA) 呈超螺旋状态。为进一步纯化出 cccDNA 分子，可在含有溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 染料和氯化铯 (CsCl) 溶液中进行密度梯度离心。EB 是一种扁平分子，它能插入双链 DNA 分子的两个相邻碱基对之间，从而降低了 DNA 分子在氯化铯中的密度。又由于 cccDNA 同 EB 的结合能力比开环 DNA 和线性 DNA 低得多，这样在氯化铯密度梯度中便可容易地将 cccDNA 同其他两种类型的 DNA 分离开来。

其他载体 DNA 分离纯化的原理与上述类似。

(二) 目的基因与载体的连接

外源 DNA 片段与载体 DNA 分子的连接，即 DNA 分子的体外重组，主要依赖于限制性内切核酸酶及 DNA 连接酶的作用。

在进行连接时，一般需要注意以下几点：①实验步骤尽可能简单容易；②在连接后，接点序列能被一定的限制酶重新酶切，以便回收插入片段；③对转录和转译过程中密码结构的阅读不发生干扰。

1. 外源 DNA 片段定向插入载体分子 用两种不同的限制酶同时酶解一种特定的 DNA 分子，如果产生具有两种不同末端（黏性末端与另种黏性末端、黏性末端与平齐末端）的 DNA 片段，那么其能与经类似处理的载体 DNA 实现定向克隆。

2. 非互补黏性末端 DNA 分子的连接 在一定的反应条件下，可用 T_4 DNA 连接酶将平齐末端的 DNA 片段有效地连接起来；对于非互补黏性末端 DNA 分子，在用特异作用于单链 DNA 的 S_1 核酸酶处理使其变成平齐末端后，也可用 T_4 DNA 连接酶进行有效的连接。不过，平齐末端 DNA 片段间的连接作用在效率上明显低于黏性末端间的连接作用，而且不能再从原位删除下来。

可采用附加衔接物的方法提高平齐末端间的连接作用效率。衔接物 (linker) 是一种人工合成的双链 DNA 短片段，其上具有一个或数个在将与其连接的载体 DNA 上不存在的限制酶识别位点。可按平齐末端连接法给平齐末端片段加上相同识别位点的衔接物，再用在衔接物中具有识别位点的合适限制酶切割，用常规方法连接。

也可利用接头进行 DNA 平齐末端间的连接。接头 (adaptor) 是一种具有黏性末端的短核苷酸双链，它与平齐末端连接后，不用经过切割即可与载体相连。

3. 连接反应的条件 为了使连接反应物中尽可能多的外源 DNA 片段插入载体分子以形成重组 DNA，必须阻止在限制酶切割后线性载体分子的自身环化作用。具体可采用以下方法。

(1) 用碱性磷酸酶处理限制酶酶解产生的线性载体分子。碱性磷酸酶可除去线性载体 DNA 分子的 5'-磷酸，而留下 3'-羟基基团。经过碱性磷酸酶处理的线性载体分子，除非插入外源 DNA 片段，否则就不能重新环化为有功能的载体分子。

(2) 采用同聚物加尾连接技术可自动防止线性载体 DNA 分子的自身环化作用，这是因为切割后形成的线性 DNA 分子的两个 3'-OH 末端，此时都已被加上具有同样碱基结构的同聚物尾巴。

(3) 应用柯斯质粒也可防止质粒 DNA 分子发生自身环化作用。

需要指出的是,在连接反应中,正确配加载体 DNA 与外源 DNA 间的比例是高效获得重组体的一个重要因素。在应用 λ 噬菌体或柯斯质粒作载体时,如果配置高比值的载体 DNA/外源 DNA 的连接反应体系,就有利于重组体分子的形成;在应用质粒作载体时,因为其重组体分子是由一个载体分子和一个外源 DNA 片段环化而成的,所以当载体 DNA 与外源 DNA 的比例为 1 时,最利于重组体分子的形成。

三、将重组体导入受体细胞 (重组转化体的获得)

根据作用原理,一般可将重组体导入受体细胞的方法主要分为生物学方法、物理学方法及化学方法。

根据受体生物,一般可将重组体导入受体细胞的方法主要分为大肠杆菌转化法、酵母转化法、植物细胞转化法及动物细胞转化法。

还要指出的是,由于选用大肠杆菌作为宿主细胞进行重组 DNA 分子的扩增,操作简便,效率较高,因此在将重组 DNA 分子导入真核细胞前,常借助于穿梭载体,先将其转化到大肠杆菌中使其扩增,后将其从大肠杆菌中提取出来,再将其转化到真核细胞中表达。

(一) 大肠杆菌转化法

1. 氯化钙转化法 (狭义的转化) 或转染 氯化钙转化法首先将对数生长期的大肠杆菌悬浮于冰预冷的低渗氯化钙溶液中处理,使细胞膜通透性增加,然后加入重组 DNA,使 DNA 与钙离子形成复合物,吸附于细胞表面,经 42℃ 短暂的热处理,促进外源 DNA 进入感受态细胞。

对于受体细胞而言,氯化钙转化法,即狭义的转化 (transformation) 是感受态的大肠杆菌细胞接受及表达质粒 DNA 分子的生命过程;而转染 (transfection) 是感受态的大肠杆菌细胞接受及表达噬菌体 DNA 分子的生命过程。在本质上,两者并无根本差别。无论狭义的转化还是转染,其关键因素都是用氯化钙处理大肠杆菌细胞,以提高其细胞膜的通透性,从而使外源 DNA 分子能容易地进入细胞内,具有较高的转化率。但一般情况下,狭义的转化得到的是转化子菌落;而转染得到的是噬菌斑。

所谓转化率是指每微克 DNA 转化受体细胞后所获得的转化子数。

在习惯上,上述狭义的转化和转染均属广义的转化。广义的转化是指将外源 DNA 引入受体生物细胞的过程。

2. 转导 转导 (transduction) 首先将重组的 λ 噬菌体 DNA 或柯斯质粒 DNA 体外包装成具有感染能力的 λ 噬菌体颗粒,然后经由在受体细胞表面的 λ 噬菌体接受器位点使这些重组体 DNA 注入大肠杆菌宿主细胞。

由于转染是一个相对低效的过程,因此在基因工程中, λ 噬菌体 DNA 等的直接转染并不常用。经常应用的是 λ DNA 体外包装技术,即首先将 λ 噬菌体 DNA 或柯斯质粒 DNA 体外包装成具有感染能力的 λ 噬菌体颗粒,然后再以其转导受体细胞。这样,大大提高了 λ 噬菌体 DNA 等外源 DNA 片段导入大肠杆菌宿主细胞的效率。

λ DNA 的体外包装是指在试管中完成噬菌体在宿主细胞内的全部组装过程。其基本原理是,

λ 噬菌体的头部和尾部的装配是分开进行的。头部基因发生了突变的噬菌体只能形成尾部，而尾部基因发生了突变的噬菌体只能形成头部。将这两种不同突变型的噬菌体提取物混合起来就能在体外装配成有生物活性的噬菌体颗粒。

一般只要为重组 DNA 提供高浓度的噬菌体前体，包括包装蛋白、头部、尾部，就有可能形成完整的噬菌体颗粒。

在用体外包装形成噬菌体颗粒的方法将重组 DNA 导入受体菌株时，每微克 DNA 可形成 10^6 个噬菌斑，比不包装的裸露 DNA 分子的效率高 100~10 000 倍。

还要指出的是，在进行 λ 噬菌体 DNA 包装时， λ 噬菌体头部外壳蛋白容纳 DNA 的能力是有一定限度的，即其头部外壳蛋白包装 DNA 的容量控制在野生型 λ DNA 长度的 75%~105%。在这个范围内，DNA 可以被包装成有活性的噬菌体颗粒，而超出这个范围就不能形成正常大小的噬菌斑。这即为 λ 噬菌体的包装限制。一般 λ 噬菌体载体的包装容量在 15 kb 左右。

(二) 酵母转化法

1. 完整细胞转化法 该法首先利用乙酸锂或氯化锂处理对数生长期的酵母细胞，然后在运载 DNA (鲑精 DNA、小牛胸腺 DNA)、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 和聚乙二醇存在下，重组 DNA 经热冲击进入酵母细胞。

在转化过程中，PEG 的作用非常重要，因为 PEG 能将大分子 DNA 沉积于受体细胞表面。

2. 原生质体转化法 酵母细胞经过用适当水解酶酶解消化细胞壁等处理后，也像大肠杆菌一样能够接受外源 DNA 重组体的导入。

该法首先利用蜗牛酶处理对数生长期的酵母细胞，然后将经酶解去除了细胞壁的原生质体悬浮于山梨醇及氯化钙的溶液中，在运载 DNA 的存在下，用聚乙二醇使重组 DNA 分子进入酵母细胞。

该法利于 DNA 多拷贝整合到酵母染色体上。

(三) 植物细胞转化法

1. 农杆菌质粒介导法 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) Ti 质粒介导法是目前研究最多、技术最成熟的用于植物细胞转化的方法。在至今所获得的转基因植株中，80% 以上是利用该法获得的。

根癌农杆菌 Ti 质粒介导法利用根癌农杆菌 Ti 质粒的 T-DNA，将外源 DNA 导入植物细胞并整合到受体核 DNA 上。

该法的一般流程如下：根癌农杆菌的培养、纯化→根癌农杆菌工程菌侵染液的制备→植物外植体的预培养→将根癌农杆菌工程菌接种到植物外植体的损伤切面→植物外植体与根癌农杆菌的共培养→植物外植体的脱菌培养→转化体的选择培养。

根据接种植物材料，一般可将根癌农杆菌 Ti 质粒介导法主要分为整体植株接种共感染法、叶盘转化法、原生质体共培养转化法等。

该法的主要特点如下：

① 成功率高，效果好。无论将根癌农杆菌工程菌接种于植物整株的伤口，还是以其感染植物离体培养细胞，通常都可获得较高的转化率。

② 在所有植物遗传转化方法中，该法技术最成熟，应用最广泛。

③Ti 质粒的 T-DNA 区可以容纳相当大的外源 DNA 片段的插入。已可将长达 50 kb 的异源 DNA 片段通过 T-DNA 完整地转入植物细胞。

④T-DNA 上含有引导 DNA 转移和整合的序列, 以及能够被高等植物细胞转录系统识别的功能启动子和转录信号, 使插入到 T-DNA 区的外源基因能够随同 T-DNA 一道在植物细胞中表达。

⑤整合进植物基因组中的 T-DNA 及插入其间的外源基因不仅能够在植物细胞中表达, 而且可以根据人们的需要连接不同的启动子, 使外源基因能够在再生植株的各种组织器官中特异性表达。

⑥该法转化的外源基因在受体植物中多以单拷贝存在, 遗传稳定性好, 并且多数符合孟德尔遗传规律。因此其转基因植株能够较好地为育种提供中间选育材料。

⑦该法的不足之处在于根癌农杆菌侵染的宿主范围主要限于双子叶植物。

在农杆菌质粒介导法中, 除了上述根癌农杆菌 Ti 质粒介导法之外, 还有发根农杆菌 Ri 质粒介导法也用于对植物细胞的遗传转化。

2. 基因枪法 基因枪法首先将外源 DNA 包被在微小的金粒或钨粒的表面, 然后在高压的作用下, 将微粒高速射入受体细胞或组织, 使微粒上的外源 DNA 进入受体细胞, 整合于染色体上。

基因枪法的一般流程如下: 金粒或钨粒的洗涤→外源 DNA-金粒或钨粒复合体的制备(在氯化钙的沉淀及在亚精胺、聚乙二醇的黏附作用下, 将外源 DNA 与金粒或钨粒混合, 吹干)→靶受体材料的准备→用 DNA-微粒复合体进行轰击→被轰击受体材料的进一步处理、培养。

基因枪法的特点如下:

①由于根癌农杆菌仅对某些双子叶植物敏感, 而对多数单子叶植物不敏感, 从而限制了根癌农杆菌 Ti 质粒介导法等的应用范围。

②靶受体细胞组织类型广泛。该法不仅可以原生质体作为受体材料, 而且可以完全细胞、组织等作为受体材料进行轰击转化。

需要指出的是, 基因枪法虽然主要用于对植物细胞的遗传转化, 但是也可用于对动物细胞、微生物等的遗传转化。

还要指出的是, 将外源 DNA 导入植物细胞的其他转化方法还有电穿孔法、超声波法、显微注射法、激光微束法、聚乙二醇法、脂质体法、花粉管通道法、生殖细胞浸泡法和病毒介导法等。

(四) 动物细胞转化法

1. 显微注射法 显微注射法首先利用非常微细的玻璃毛细管携带外源 DNA, 在显微镜下直接将外源 DNA 注射到动物受精卵细胞核中, 然后将导入外源 DNA 的受精卵经体外培养、检测后作胚胎移植。

该法的主要特点如下:

①体外受精。从受体动物的卵巢里获得卵母细胞, 体外孵育成熟, 加入精子, 进行体外受精, 并进行受精卵的体外培养。

②在胚胎移植前检测、鉴定外源 DNA 的整合, 可定向挑选具有目的基因整合的胚胎进行移植。

③改进胚胎移植技术可以减少受精卵的损伤，提高受精率。

2. 磷酸钙共沉淀法 磷酸钙共沉淀法首先将一定浓度的氯化钙和外源 DNA 置于含有靶细胞的磷酸缓冲液中，然后调节 pH 使外源 DNA 与钙结合形成白色的共沉淀。这些白色沉淀可沉积于靶细胞细胞膜的表面，阻断溶酶体酶的活性，改善细胞膜的通透性，并诱导细胞吞噬，从而使外源 DNA 进入靶细胞。

该法适于多种细胞，并可形成稳定的转化子。

3. 电穿孔法 电穿孔法 (electroporation) 是指利用高压电脉冲使细胞膜形成小孔而导入外源 DNA 的技术。

该法的一般流程如下：将外源 DNA 与待转化的细胞置于特制的装置内→在高压脉冲电场作用下，电脉冲可使细胞膜产生瞬时可逆性穿孔→同时，通过细胞的胞饮作用，外源 DNA 被摄入细胞→外源 DNA 整合到细胞的基因组上。

该法适于导入环型 DNA 及线形 DNA；既适于外源 DNA 的瞬时表达，也适于外源 DNA 的稳定转化，更适于用磷酸钙共沉淀法无效的细胞的转化；既适于动物细胞的转化，也适于植物细胞和微生物的转化。

4. 病毒感染法 病毒感染法首先将外源 DNA 与病毒重组，将其包装，形成完整病毒颗粒，然后将病毒颗粒释放到培养基上，使其在聚乙二醇的作用下感染受体细胞，进行基因转移。

该法利用的病毒有 RNA 病毒 (例如逆转录病毒) 和 DNA 病毒 (例如腺病毒)。

需要指出的是，将外源 DNA 导入动物细胞的其他转化方法还有阳离子脂质体法、细胞融合法等。

四、重组转化体的筛选和鉴定

(一) 利用表型特征进行筛选 (遗传检测法)

表型 (phenotype) 是指机体遗传组成同环境相互作用所产生的外观或其他特征。

供筛选用的表型特征来自两个方面：一是克隆载体提供的，这是主要的；一是外源 DNA 提供的，这是次要的。

1. 利用载体提供的表型特征进行筛选

(1) 抗药性标记基因插入失活筛选法。插入失活效应是指外源 DNA 插入载体后使载体某种生物功能丧失的现象。

常见的插入失活有抗药性选择标记基因插入失活。例如，pBR₃₂₂ 载体含有 *amp^r* 和 *tet^r* 两个抗药性选择标记基因。如果没有插入外源 DNA，其表型为 Amp^r Tet^r。但是，如果将外源 DNA 插入抗药性选择标记基因内的任一酶切位点，相应抗药性选择标记基因即被插入失活。因此，将经重组体转化处理后的大肠杆菌置于含有相应抗菌素的生长培养基上进行培养，即可容易地筛选出重组转化体。

(2) β -半乳糖苷酶显色反应筛选法。在 β -半乳糖苷酶失活的 λ 插入型载体的基因组中含有一个大肠杆菌的 *lac₅* 区段，此区段编码 β -半乳糖苷酶基因 *lacZ*。在诱导物 IPTG (异丙基硫代半乳糖苷) 存在下， β -半乳糖苷酶能作用于 Xgal (5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷) 形成蓝色复合物

(5-溴-4-氯靛蓝)。将被这种 λ 载体感染的大肠杆菌 lac^- 指示菌涂布于加有 IPTG 和 Xgal 的培养基平板上, 就会形成蓝色的噬菌斑。但是, 如果在 lac_5 区段插入外源 DNA, 就会阻断 β -半乳糖苷酶基因 $lacZ$ 的编码序列, 那么被这种 λ 重组体感染的 lac^- 指示菌由于不能合成 β -半乳糖苷酶而只能形成无色的噬菌斑。因此, 根据此种显色反应即可筛选出含有外源 DNA 插入序列的重组转化体克隆。

2. 利用外源 DNA 提供的表型特征进行筛选 这种筛选法要求外源 DNA 是一个完整的基因, 而且能够在大肠杆菌或其他受体细胞中实现功能表达。

该法基本原理如下: 与载体重组的外源 DNA 完整基因对大肠杆菌转化宿主菌株所具有的突变能够产生体内抑制或互补效应, 从而使宿主细胞表现出外源基因所编码的表型特征; 或与载体重组的外源 DNA 完整基因赋予受体细胞、组织、个体等新的遗传信息, 从而使遗传转化受体表现出外源基因所编码的表型特征。

3. 利用噬菌斑的形成进行筛选 以 λ 噬菌体载体与外源 DNA 构建的重组体的筛选主要依赖于重组体的大小及形成噬菌斑的能力。

重组体 DNA 只有在为野生型 λ 噬菌体 DNA 的 75%~105% 的长度时, 才能在培养平板上形成清晰的噬菌斑, 而载体 DNA 本身是不会包装成活的噬菌体颗粒的。

此外, 在免疫功能失活的插入型载体的基因组中有一段免疫区, 此区段带有 1~2 种限制性内切核酸酶的单一酶切位点。如果外源 DNA 插入该位点, 就会使载体所具有的合成活性阻遏物的功能遭受破坏, 从而不能进入溶原周期。因此, 凡是有外源 DNA 插入的 λ 重组噬菌体都只能形成清晰的噬菌斑; 而没有外源 DNA 插入的亲本噬菌体就会形成混浊的噬菌斑。根据上述噬菌斑的形态, 即可筛选出 λ 重组体。

4. 利用遗传互补作用进行筛选 如果在转化宿主细胞后, 重组体的表达产物可与宿主的营养缺陷型突变发生互补作用, 那么根据这种特性, 即可筛选出重组转化体。

该法尤其适于外源基因导入哺乳动物后对重组转化体的筛选。例如, 真核细胞在核苷酸生物合成时, 二氢叶酸还原酶基因 ($dhfr$) 编码的二氢叶酸还原酶催化二氢叶酸还原生成四氢叶酸, 然后利用四氢叶酸合成胸腺嘧啶。 $dhfr^-$ 表型真核细胞 (突变型) 不能合成四氢叶酸, 因此必须在培养基中添加胸腺嘧啶才能生长。以目的基因与具有 $dhfr$ 基因的载体所构建的重组体转化的 $dhfr^-$ 细胞能够合成四氢叶酸, 核苷酸合成也能顺利进行, 转化的 $dhfr^-$ 细胞能够在不加胸腺嘧啶的培养基中存活; 而未经 $dhfr$ 基因转化的 $dhfr^-$ 细胞则会死亡。

(二) 物理筛选鉴定法

1. 电泳检测法 根据 DNA 分子量的大小, 以凝胶电泳检测重组体。

2. R-环检测法 R-环是指 RNA 通过取代与其序列一致的 DNA 单链而与另一单链 DNA 杂交, 被取代的 DNA 单链与 RNA-DNA 杂交双链所形成的环状结构。

R-环的形成是在 70% 甲酰胺溶液中接近 DNA 变性温度时, 杂交双链 DNA-RNA 分子比双链 DNA-DNA 分子更稳定所致。R-环结构一旦形成就十分稳定。因此, 应用 R-环检测法可鉴定出双链 DNA 中存在的与特定 RNA 分子同源的区域 (可在电子显微镜下观察)。

(三) 利用限制性内切核酸酶酶切进行鉴定

选择适当的限制酶对重组体 DNA 进行酶切鉴定。

(四) 利用核酸杂交进行鉴定

所用的核酸杂交法就是常用的几种核酸杂交法，例如 Southern 杂交、Northern 杂交等。其基本原理已如上所述。

(五) 利用 PCR 技术进行鉴定

利用 PCR 技术可以对目的基因等特异核酸进行鉴定。其基本原理前面已经介绍。

(六) 利用免疫学方法进行筛选鉴定

该类方法基本原理如下：以目的基因在受体细胞中的表达产物（多肽）作抗原，以该基因产物的免疫血清作抗体，根据抗原-抗体反应，即可筛选鉴定出目的基因克隆及其产物。

1. 放射性抗体检测法 该法的一般流程如下：将转化的菌体涂布在琼脂培养基平板上→待出现菌落后，将其影印到另一琼脂平板上继续培养，保留原来的琼脂平板作为母板→待影印琼脂平板上的菌落长好后，将其置于含有氯仿饱和气体的容器中使菌落裂解，阳性菌落便释放出抗原→将吸附了未标记 IgG 抗体的聚乙烯薄膜覆盖在琼脂平板表面。如果抗原与抗体具有对应关系，在薄膜上就会形成抗原-抗体复合物→取下聚乙烯薄膜，再用¹²⁵I 标记的 IgG 处理，¹²⁵I-IgG 便会与结合在聚乙烯薄膜上的抗原决定簇结合→漂洗聚乙烯薄膜，除去过剩的¹²⁵I-IgG，在空气中使之干燥→作放射性自显影，判断结果→从母板上获得所需重组克隆。

2. 免疫沉淀检测法 免疫沉淀检测法首先在生长菌落的琼脂培养基中加入专门抗某种蛋白质的特异性抗体，如果有些菌落的细菌分泌出这种蛋白质，那么在其周围就会出现一个由沉淀素 (precipitin) (抗体-抗原沉淀物) 所形成的白色圆圈。

3. 酶联免疫吸附检测法 酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immuno-sorbent assay, ELISA) 是指基于固相-液相的抗原-抗体反应体系，采用酶标记，通过酶反应对抗原与抗体的结合进行检测的方法。

该法的一般流程如下：制备抗原制剂→免疫动物→制备抗血清→纯化抗体→使抗体与合适酶 (例如，辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶) 交联，即以酶标记抗体→将抗体 (或抗原) 固定于固相载体 (例如，多孔的聚苯乙烯微量反应板) 的表面→利用抗原与抗体结合的免疫反应，将样品中的特异抗原固定下来→加入酶标抗体，形成抗体-抗原-酶标抗体复合物→洗去未结合的酶标抗体→加入合适酶的显色或荧光底物→通过酶促反应所发生的颜色或荧光变化检测出抗原的量。

(七) 利用 Western 杂交进行鉴定

Western 杂交是将蛋白质电泳、吸印、免疫测定融为一体的特异蛋白质的检测方法。

该法的一般流程如下：从外源目的基因的重组转化体中提取蛋白质→将所提取的蛋白质经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，使蛋白质按分子大小分离→将分离的各蛋白质条带原位不变地转移到固相膜上→将膜在高浓度的蛋白质溶液中温育，以封闭非特异性位点→加入特异第一抗体，使特异第一抗体与转移到固相膜上的目的蛋白质 (抗原) 结合→加入能够与特异第一抗体专一结合的标记的第二抗体→根据第二抗体上标记化合物的性质进行检测。根据检测结果，可知被检重组转化体外源目的基因表达与否、所表达蛋白质量的多少及其分子量的大小。

(八) 利用核苷酸序列测定进行鉴定

利用核苷酸序列测定技术可以对目的基因等特异核酸进行鉴定。

(九) 转译筛选鉴定法

转译筛选鉴定法利用无细胞翻译系统 (cell-free translation system) 检测经处理后的 mRNA 的生物学功能。其突出优点是能明确克隆的 DNA 与其编码的蛋白质之间的对应关系。

根据对 mRNA 的处理, 可将转译筛选鉴定法主要分为阻断转译杂交法和释放转译杂交法。常用的无细胞翻译系统有麦胚提取物系统和网织红细胞提取物系统。

1. 阻断转译杂交法 该法的基本原理如下: 在体外无细胞转译系统中, mRNA 一旦同克隆 DNA 杂交后就不能再指导蛋白质多肽的合成, 即 mRNA 的转译被阻断抑制了。

2. 释放转译杂交法 该法的一般流程如下: 将克隆 DNA 结合到硝酸纤维素滤膜上→与未经分离纯化的 mRNA 或细胞的总 RNA 杂交→漂洗滤膜, 在低盐缓冲液或含有甲酰胺的缓冲液中加热, 将杂交的 mRNA 洗脱下来 (将 mRNA 释放出来)→用回收的 mRNA 进行体外转译→用聚丙烯酰胺凝胶电泳和放射性自显影分析鉴定转译产物, 也可测定蛋白产物的生物活性。

五、克隆基因的表达

基因工程研究的最终目的就是使外源基因在受体生物系统 (原核生物系统或者真核生物系统) 中高效表达, 而基因表达一般包括转录和转译两个过程。

(一) 原核生物系统与真核生物系统中基因表达的不同特点

1. DNA 的存在状态不同 在细菌中, 大部分 DNA 处于非结合状态, 某些蛋白质存在于折叠的染色体中。而真核生物的 DNA 与组蛋白结合形成染色体, DNA 也与多种非组蛋白结合, 只有一小部分 DNA 是裸露的。

2. 重复序列的不同 在细菌中, 除了重复的 rRNA 和 tRNA 基因和少数特异性短顺序 (例如启动子中某些部分) 之外, 很少重复顺序。而真核生物的 DNA 有相当一部分是由几种核苷酸顺序重复几百乃至几百万份所组成。有些顺序呈串联重复, 但大多数重复顺序并非如此。

3. 内含子和转录后加工系统是否存在 原核生物基因一般没有内含子, 在原核生物中缺乏真核生物的转录后加工系统。因此, 在具有内含子的真核生物基因于原核生物中转录成 mRNA 后, 其中的内含子不能被切除。在真核生物中, 基因的碱基和基因产物的氨基酸通常不是对应的线性关系, 真核 DNA 中相当多的碱基顺序是不翻译的。大多数真核基因都具有内含子, 在翻译开始前 mRNA 必须经过加工。用于指导蛋白质合成的模板 mRNA 分子, 其大小一般仅占初级转录本的 10% 左右。在 mRNA 加工过程中, 内含子被删除掉, 外显子则重新结合为成熟的 mRNA 分子。

4. 基因表达的单位不同 原核生物的基因表达是以操纵子为单位的。操纵子是数个相关的结构基因及其调控区的结合。调控区主要分为 3 个部分: 操纵基因、启动基因 (启动子) 及其他有调控功能的部位。在真核生物中, 通常只能从成熟的 mRNA 分子上翻译出一种多肽链。

5. RNA 聚合酶的种类不同 原核生物只有 1 种 RNA 聚合酶, 识别原核系统的启动子, 催化所有 RNA 的合成。而真核生物有 3 种 RNA 聚合酶, 分别参与不同类型 RNA 的合成。

6. 核膜的有无决定着转录与转译是否偶联 由于原核生物无核膜, 因此转录与转译是偶联的, 二者也是连续进行的。原核生物染色体 DNA 是裸露的环形 DNA, 转录成 mRNA 后, 可直

接在细胞质中与核糖体结合转译形成蛋白质。而在真核生物中，RNA 在核中合成，必须穿过核膜运入细胞质内才能被利用。

7. 转录的控制不同 在原核生物中，在 mRNA 的合成还未完成时，蛋白质（或多肽）的转译即已开始。原核生物基因表达的控制主要在转录水平。在真核生物双链 DNA 分子上，某基因中只有一条链（有义链）转录成 mRNA，另一条链为反义链。在含有多个基因的 DNA 双链中，每个基因的有义链并不都在同一链上，即在同一条链上既具有一些基因的有义链，也含有另外一些基因的反义链。

8. 真核生物 mRNA 分子的 5'端和 3'端都会发生修饰作用 例如，在其 5'端具有一个被称为“帽”的结构，而在其 3'端则具有一条很长的多聚腺苷酸（可长达 200 个核苷酸）尾，即通常所指的 poly (A) 序列。

9. mRNA 的寿命不同 许多真核生物的 mRNA 分子的寿命都比原核生物的长。

10. S-D 序列是否存在 在大肠杆菌原核生物 mRNA 的核糖体结合位点上，含有一个转译起始密码子及与 16 S 核糖体 RNA 的 3'端碱基互补的序列，即 S-D 序列。而真核生物则缺乏此序列。

（二）外源基因在受体生物细胞中正确表达的条件

1. 启动子 启动子（promoter）是指 DNA 链上一段能与 RNA 聚合酶结合并能起始 mRNA 合成（转录）的序列。其是基因表达不可缺少的重要调控序列。如果没有启动子，就不能进行转录。

原核生物启动子是由两段分开、但高度保守的核苷酸序列组成的。其中之一为 Pribnow box，位于转录起始点上游 5~10 bp，一般由 6~8 个碱基组成，富含 A、T，因此其又称为 TATA box 或 -10 区；另一序列为 -35 区，位于转录起始点上游 35 bp 处，一般由 10 个碱基组成。

由于原核生物 RNA 聚合酶不能识别真核基因的启动子，因此在原核生物中表达载体的启动子必须为能被原核生物 RNA 聚合酶识别的原核启动子。将外源基因克隆在其下游，使外源基因（原核基因或真核基因）在原核生物细胞中转录。

在原核生物表达系统中，通常选用可调控的强启动子，例如：lac（乳糖启动子）、trp（色氨酸启动子）、 λ P_L（ λ 噬菌体的左向启动子）、tac（乳糖和色氨酸的杂合启动子）等。

2. S-D 序列 mRNA 在细菌等原核生物中的转译效率严格依赖于其上的核糖体 RNA 的结合位点，即 S-D 序列以及 S-D 序列与起始密码子 AUG 之间的距离。

所谓 S-D 序列是指位于 mRNA 的 5'端不转译的前导区段内起始密码子 AUG 上游 3~10 bp 处的由 3~9 个碱基组成的一段序列。该段序列富含嘌呤核苷酸，与 16 S rRNA 的 3'端富含嘧啶的序列（AUUCCUCCACUAG）互补，是核糖体 RNA 的识别和结合位点，控制转译的起始。

3. 起始密码子 起始密码子（initiation codon）是指规定多肽链的第一个氨基酸的密码子。细菌的起始密码子或为 AUG，它转译为 N-甲酰基甲硫氨酸（一种修饰的氨基酸）；或较罕见的 GUG，它转译为缬氨酸。真核生物的起始密码子为 AUG，并转译为甲硫氨酸。其也用来表示 DNA 中的相应顺序 ATG。

4. 终止子 终止子（terminator），即转录终止子，是指位于一个基因或操纵子 3'末端后的一段特定核苷酸序列，其具终止转录的功能。

在构建表达载体时，为防止所克隆外源基因的表达干扰载体的稳定性，一般都在多克隆位点的下游插入一段很强的核糖体 RNA 的转录终止子。

5. 转译后的修饰与加工 在真核细胞中，有时需要将前体蛋白降解为功能蛋白；有时需要进行某种修饰，例如，糖基化为糖蛋白。在细菌中，外源真核基因表达成融合蛋白比表达成非融合蛋白更为稳定。

融合蛋白是指其氨基端（N 端）是原核细胞序列，羧基端（C 端）是真核细胞序列。这种融合蛋白仍具有真核细胞的抗原性，可用作抗原。

（三）外源基因在受体（原核）生物细胞中高效表达的调控

1. 选用强启动子及增强子 强的启动子可产生较多的 mRNA，而弱的启动子则相反。通过比较不同的启动子，可发现其上两个区域的序列是高度保守的。在原核细胞中，一个区域是位于转录起点上游 10 bp 的 -10 区的 TATAAT 序列（Pribnow box）；另一个区域是 -35 区的 TTGACA 序列。这两个区域对于决定启动子的强度是很重要的。除了少量例外，一般启动子相应序列与上述保守序列越相似，其启动子的表达能力越强。两个保守区之间的序列长度对启动子的功能也有影响。据文献报道，间隔 17 bp 的启动子功能最强。在真核细胞中，一个区域是位于 -12 ~ -32 之间的 TATAATATA 序列（TATA box）；另一个区域是位于 -70 ~ -80 之间的 GGTC AATCT 序列。

此外，还有一个称作增强子（enhancer）的 72 bp 的重复序列，多位于更上游处，有时也位于基因 3' 端的下游区或位于内含子中，其作用为促进基因转录，增强基因表达。

2. 调整 S-D 序列与 AUG 之间距离 以此达到最佳的转译效率。

3. 优化转译起始相关序列 当连接在 S-D 序列后的 4 个碱基为 4 个 A (T) 时，其转译作用最有效；而当连接在 S-D 序列后的 4 个碱基为 4 个 C (或 4 个 G) 时，其转译效率则只有最高转译效率的 50% (或 25%)。直接位于起始密码子 AUG 左侧的密码三联体的碱基组成也会影响转译效率。例如，当 β -半乳糖苷酶的 mRNA 的此密码三联体为 UAU 或 CUU 时，其转译最为有效；当为 UUC、UCA 或 AGG 时，其转译水平即下降 20 倍。

4. 优化起始密码子下游密码子组成 使外源基因能在受体细胞中转录。

5. 采用转录终止子 在克隆基因的末端，存在一个转录终止子是十分重要的。其原因主要如下：①若干非必须转录本的合成会使细胞消耗巨大的能量用于制造大量不必要的蛋白质；②在转录本上有可能形成一些不期望出现的二级结构，从而降低了转译效率；③偶尔会出现启动子阻塞现象（promoter occlusion），即克隆基因启动子所开始的转录会干扰另一个必要基因或调节基因的转译。而转录终止子的存在可使上述现象得以避免。因已发现，有些强启动子会通读到 ROP（蛋白质阻遏物）基因，干扰质粒的复制，导致质粒拷贝数下降。

6. 提高质粒拷贝数及其稳定性 提高基因拷贝数，即基因剂量的最简单易行的方法如下：将基因克隆到高拷贝数的质粒载体上。ROP 基因的缺失，或是 RNA I（不转译的 RNA 分子）基因的突变，都会引起 Col E I 派生质粒拷贝数的增加。由缺陷性分配引起的质粒丢失现象称作质粒分离的不稳定性（segregative instability）。天然产生的质粒都可稳定地保持在宿主细胞内，这是由于它们具有一个分配功能区 par 所致。如果需要避免缺失了 par 区的质粒（例如 pBR₃₂₂）的宿主细胞在分裂时产生无质粒细胞，可以通过对细胞群体保持抗生素的选择压力达到；也可通

过对无质粒的细胞进行反选择，以解决质粒分离不稳定性问题。

7. 诱导受体细胞生长与外源基因表达分开 一般采用温度诱导或药物诱导。

8. 诱导受体细胞生长与表达载体复制分开 将受体细胞的生长与表达载体的复制分开。当受体细胞迅速生长时，抑制载体的复制；当其生物量积累到一定水平后，再诱导载体复制，增加载体的拷贝数，从而提高外源基因的表达水平。

9. 表达分泌蛋白 为避免外源基因所表达的蛋白产物在宿主细胞内积累而易被其蛋白酶降解，同时为减轻宿主负荷而提高其表达效率，一般可利用多种技术促进外源基因所表达蛋白产物自宿主细胞内至细胞外的分泌。通常利用 N-端信号肽将蛋白质分泌至细胞外。

10. 表达融合蛋白 为了得到正确编码的表达蛋白质，在插入外源基因时，其阅读框架应与原核 DNA 片段的阅读框架一致。在融合蛋白质被表达后，必须从融合蛋白质中将原核多肽去除。

第三节 基因工程在食品科学中的应用

基因工程作为一门重要的高新技术广泛应用于分子生物学研究及制药工业、疾病诊治、动物和植物品种改良、食品工业、环境保护和能源工业等众多领域。基因工程在食品科学中的应用主要涉及以下几个方面：①基因工程与动物、植物、微生物产品品质的改良；②基因工程与植物产品贮藏保鲜；③基因工程与食品新资源的开发。

一、基因工程与动物、植物和微生物产品品质的改良

(一) 培育抗病虫害、抗除草剂的植物新品种及抗冻动物新品种的基因工程

植物病虫害及杂草常使食品原料产品的生产遭受严重损失。化学农药等的施用虽然在作物生产中发挥了重要的作用，但是其在食品中的残留以及在人类食品链中的积累，不仅严重危害人体健康，而且严重污染环境。基因工程技术为抗病虫害、抗除草剂的作物品种的培育提供了新途径，从而使人们获得既不危害人体健康也不污染环境的真正的绿色食品。

在动物基因工程方面，利用转抗冻蛋白等基因动物对低温等逆境条件适应能力的增强，使动物的养殖更具经济意义。

1. ICP 基因工程 ICP 基因来自于苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt)。苏云金杆菌为革兰氏阳性菌。当细菌的营养体生长发育到一定阶段后，在其一端形成芽孢，在另一端形成伴胞晶体。伴胞晶体主要由蛋白质和糖类组成。当昆虫吞食伴胞晶体后，在昆虫肠道碱性条件和特定蛋白酶的作用下，伴胞晶体蛋白变成有活性的毒性分子。这种蛋白为 δ -内毒素 (δ -endotoxin)，被称作杀虫结晶蛋白 (insecticidal crystal protein, ICP)。ICP 常以原毒素 (protoxin) 形式存在。当 ICP 被昆虫取食后，在昆虫消化道内，其在碱性条件下溶解、被专一性蛋白酶水解而活化。活化后的 ICP 与昆虫肠道上皮细胞上的特异性结合蛋白结合而转型为毒性多肽分子。结合转型后的 ICP 全部或部分地嵌合于细胞膜中，致细胞膜产生一些孔道，使细胞由于渗透平衡被破坏而破裂。随之，昆虫幼虫将停止进食，最终死亡。

在 ICP 基因工程中,主要运用农杆菌介导法、基因枪法等对植物进行遗传转化。但转 ICP 基因植物中的杀虫结晶蛋白表达量多偏低,难对害虫产生有效的毒杀作用。这是由于普遍使用的杀虫晶体蛋白基因来源于细菌,天然的 ICP 基因富含 A-T 碱基,而植物基因一般 G-C 碱基比例较高。这一差异可能导致 ICP 基因转录的未成熟终止及不适当的切割。同时,ICP 基因和植物基因在密码子上的差异也可能使 ICP 基因在植物细胞的转录过程中形成二级结构,mRNA 的特定序列被降解和翻译效率降低,最终导致 ICP 基因在植物中表达水平不高。针对上述问题,研究人员在不改变氨基酸序列的情况下对 ICP 基因 CryIA (b) 和 CryIA (c) 进行修饰(主要是去除富含 A-T 碱基序列,使用植物偏爱密码子,使用 CaMV 35 S 强启动子),使其在植物中的表达水平提高了上百倍,获得了良好的抗虫效果。

此外,将转 ICP 基因植物与常规商品化的优良植物品种进行杂交,培育出了一些转 ICP 基因的植物新品种。这种方法可在转基因育种中广泛应用。

研究人员用 CaMV 35 S 启动子控制下的来自 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 的 CryIA (b) 基因转化番茄品系 VF₃₆。获得的转基因植株对烟草天蛾显示出高水平的抗虫活性,但对番茄果蝇 (*Heliothis virescens*) 的抗性不是很强。研究人员以 ICP 基因转化番茄,所获得的转化植株能抗马铃薯甲虫的幼虫。

研究人员合成了 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 的 CryIA (b) 基因片段。该合成基因与野生型基因只有 65% 的同源性。合成基因富含 G-C 碱基。利用基因枪将该合成基因导入玉米,并对筛选出的两个转基因玉米品系进行了田间试验。一个转基因玉米品系的 CryIA (b) 基因由 CaMV 35 S 启动子调控,而另一个转基因玉米品系的 CryIA (b) 基因分别由玉米磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPCase) 基因启动子和玉米花粉特异性表达启动子调控。后一转基因品系中 CryIA (b) 基因的表达显示出明显的组织特异性。在绿色组织中,该基因表达强烈,能抵御欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 在生长季中的反复危害。

为了防止昆虫对转 ICP 基因植株产生耐受性,需要注意以下几点:①使用组织特异性启动子或化学诱导启动子。组织特异性启动子的使用可使 ICP 基因的表达局限于植物的重要组织,例如棉花的棉铃中,以便未经选择的害虫能在叶片上存活。此外,病原相关蛋白 (pathogenesis-related protein, PR 蛋白) 是植物受到病原物侵染或其他刺激时表达的一组蛋白。PR-1a 是编码一种 PR 蛋白的基因,可被水杨酸等化学刺激物诱导。因此,利用化学诱导启动子可以调控 ICP 基因只在化学诱导剂存在下表达,从而降低抗性的选择压产生,以防止抗性扩散。②通过对 ICP 基因进行修饰,使其在植物中高效表达。迄今,田间发现的高水平的 ICP 抗性基因都是隐性基因,而且 ICP 对害虫的幼虫特别有效,因此 ICP 基因连续高效表达可消除突变杂合体。③将转基因植株和非遗传工程植株混种,以保证在繁育群体中保留一部分未经选择的害虫。④同时使用两种以上 ICP 基因转化植株,或联合使用 ICP 基因和其他类型的抗虫基因。

2. 蛋白酶抑制剂基因工程 在自然界中的所有生命体中,尤其在植物中,都含有蛋白酶抑制剂 (proteinase inhibitor, PI)。蛋白酶抑制剂是一类蛋白质,在大多数植物的种子及块茎中,其含量可高达总蛋白的 1% ~ 10%,在有些果实中丝氨酸蛋白酶抑制剂的含量可达总蛋白的 30%。

蛋白酶抑制剂在植物抵抗昆虫和病原体侵染的天然防御系统中起着重要作用。其具明显的抗

虫作用，主要机理如下：蛋白酶抑制剂与昆虫消化道内的蛋白消化酶相结合形成酶抑制剂复合物(EI)，阻断或减弱了蛋白酶对于外源蛋白质的水解作用，导致蛋白质不能被正常消化；同时EI复合物能刺激昆虫过量分泌消化酶，这一作用使昆虫产生厌食反应。这样，由于昆虫缺乏生长代谢中所必需的一些氨基酸，因此发育不正常或死亡。此外，蛋白酶抑制剂分子可通过消化道进入昆虫的血淋巴系统，从而严重干扰昆虫的蜕皮过程和免疫功能，以致昆虫不能正常发育。

蛋白酶抑制剂作用于蛋白消化酶的活性中心。活性中心是酶最保守的部位，产生突变的可能性极小，因此可排除昆虫通过突变产生抗性的可能性。蛋白酶抑制剂对人畜无害，因为人畜的消化机理与昆虫的明显不同。人畜的蛋白消化酶主要存在于肠道中，而蛋白酶抑制剂在胃中酸性条件下被胃蛋白酶分解，而至今尚未发现植物中存在胃蛋白酶的抑制剂。

植物中存在三类蛋白酶抑制剂：丝氨酸蛋白酶抑制剂、巯基蛋白酶抑制剂及金属蛋白酶抑制剂。其中，丝氨酸蛋白酶抑制剂与抗虫关系密切，因为大多数昆虫的蛋白消化酶为丝氨酸蛋白酶。而巯基蛋白酶抑制剂对于利用巯基蛋白酶消化的鞘翅目昆虫具有独特抗性。在丝氨酸类蛋白酶抑制剂中，豇豆胰蛋白酶抑制剂(CpTI)的抗虫效果最为理想，其抗虫谱广，对于许多给农业生产造成重大经济损失的害虫都具有抗性。

研究人员将编码CpTI的cDNA转移到烟草中。该cDNA长550bp，由CaMV 35 S启动子调控。获得的转基因烟草植株能正确高效地表达CpTI基因，表现了明显的抗虫性，且CpTI的表达量与抗虫能力呈正相关。

研究人员利用不同的启动子及 Ω 因子(来自烟草花叶病毒126 kD蛋白基因转录序列5'端非转译区，由68 bp组成，能促进mRNA的翻译，与原核70S及真核80S核糖体结合促进外源基因在原核与真核系统中的表达。其常作为翻译增强子用于植物基因工程)与CpTI基因构建不同的植物表达载体。以CaMV 35 S启动子串联 Ω 因子调控的CpTI基因转化烟草，在所获得的转基因烟草中CpTI基因得到了较好表达，但其高效表达引起了转基因烟草白化。

3. 其他抗虫基因工程 研究人员先将含有雪花莲外源凝集素基因(GNA)的质粒pRSS-GNA₁通过冻融法转化到根癌土壤杆菌菌株LBA₄₄₀₄中，再采用叶盘法转化番茄栽培品种“C₈”、“A₃₉”和“A₅₃”，获得了含GNA基因的43株转化植株。通过卡那霉素抗性鉴定、Npt-II基因PCR和GNA基因Southern blot分析表明，GNA基因已整合到番茄的基因组中。初步抗蚜虫(*Myzus persicae*)试验证明，转基因番茄有一定的抗蚜虫效果。3株转基因植株中的Npt-II基因在自交子代中的分离比例符合3:1孟德尔遗传规律。

4. 抗病毒病基因工程 外源的病毒外壳蛋白(coat protein, CP)基因在导入植物细胞后，可能由于其RNA转录体与入侵病毒RNA间的相互作用使植物细胞获得保护。

缺失AUG的不完整CP基因或CP基因部分序列的反义RNA基因整合到植物染色体上的转基因植株也可获得对相应病毒很强的抗性，而且转基因植株获得的抗性与植物细胞中整合的CP基因拷贝数有关，含有多个CP基因拷贝的转基因植株比含有一个拷贝的植株有更强的抗性。

研究人员以黄瓜无菌苗子叶切段为外植体，通过叶盘转化法与根癌农杆菌进行共培养建立了黄瓜的转基因系统。农杆菌菌株为LBA₄₄₀₄，内含双元载体pBPM WMV。该质粒载体带有一个Npt-II基因(筛选具有卡那霉素抗性的植株)和一个WMV-2 CP基因。抗卡那霉素的黄瓜植株经DNA分子点杂交、PCR检测及Southern blot证实，外源WMV-2 CP基因确实已导入黄瓜细

胞且能稳定地遗传到子一代。获得的转基因子一代植株对 WMV-2 表现出较强的抗性,可以延迟发病时间,减轻发病程度。

研究人员分别将烟草抗 TMV 的 N 基因、CMV 的 CP 基因、CMV 卫星 DNA 的 cDNA、TYLCV 的 CP 基因、AIMV 的 CP 基因等转入番茄,所获得的转基因植株均对相应的病毒侵染表现抗性。

复制酶 (replicase, RP) 是由病毒编码,能特异合成病毒正链和负链 RNA 的 RNA 聚合酶。其核心功能是合成全长的病毒基因组 RNA。许多病毒 RP 基因近 3' 末端含有的编码 G-D-D (Gly-Asp-Asp) 特征基序的保守序列被推断为 RP 的活性中心。研究人员获得了转番木瓜环斑病毒 (PRV) 复制酶基因的番木瓜,转基因植株对 PRV 有高度抗性,且优于 PRV 外壳蛋白介导的抗病性。在人工接种 3 次后继续接受自然接种,一年半未见任何症状,开花结果正常,果实风味正常。

脊椎动物细胞在受病毒感染后能合成并分泌干扰素。干扰素是一类小分子量的蛋白质,能结合在细胞质膜上,并导致抗病毒态的形成。干扰素作用特别强,且它赋予细胞对病毒的抗性是广谱的。干扰素使寡核苷酸合成酶、内切核酸酶和激酶的产生加强,从而导致抗病毒态。这三种酶平时处于静止状态,而在易感细胞被病毒感染或经双链 RNA 作用后才活化。这些酶活化后通过两条途径来阻断蛋白质的合成:一是活化后的激酶将蛋白质合成过程中所需的起始因子磷酸化,使其丧失活性;一是由寡腺苷酸激活内切核酸酶,使 mRNA 降解。

研究人员将大鼠中编码干扰素之一的 2, 5-寡腺苷酸合成酶的基因导入马铃薯。转基因植株的叶和块茎中 PVX 病毒浓度显著低于未转化的对照,且也低于转 CP 基因的植株。

5. 抗真菌病基因工程 几丁质酶是一种广泛存在于植物、动物及微生物中的水解酶,具有降解几丁质(聚 N-乙酰氨基葡萄糖)的作用。几丁质是大多数病原真菌细胞壁的主要成分。几丁质酶通过降解菌丝尖端新合成的几丁质而抑制病原菌的生长。

Brogliè 等在克隆菜豆几丁质酶基因的基础上将该基因 CH₅B 进行修饰改造,用花椰菜花叶病毒 CaMV 35 S 组成性表达的强启动子取代 5' 端调节区中天然的诱导性表达启动子。将该基因通过 Ti 质粒转化烟草,获得了几丁质酶的高效表达。转基因植株对立枯病菌 (*Rhizoctonia solani*) 抗性显著增强。Chet 等将来自黏质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 的几丁质酶 ChiA 基因转入烟草,对立枯病菌也有较好防治效果。

研究人员利用农杆菌转化法,以组成型表达 β -1, 3-葡聚糖酶及几丁质酶基因的双价植物表达载体 pBLGC 转化优质甘蓝型油菜品种,获得了转基因再生植株。转基因植株活体接种油菜菌核病菌的试验表明,部分转基因植株比对照显示较强的抗病性。

核糖体灭活蛋白 (RIP) 来自植物,是一类作用于真核生物细胞核糖体,能抑制蛋白质合成的蛋白毒素。RIP 不灭活自身的核糖体,却能特异地作用于亲缘关系较远的种类,如真菌的核糖体。从大麦中分离出的 RIP 能抑制真菌的活性,其与几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶有协同增强作用。研究人员将分离出的大麦 RIP 基因和创伤诱导启动子相连接,导入烟草中。获得的转 RIP 基因烟草植株和未转化植株相比,对立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 侵染的抗病性增强。

已知 1, 2-二苯乙烯是介导植物抵抗病原体的物质。研究人员将来源于葡萄的两个合成 1, 2-二苯乙烯的酶基因 Vst₁ 和 Vst₂ 导入番茄中,然后将其与晚疫病真菌共培养。试验结果表明,

在番茄植株体内产生了 1, 2-二苯乙烯的相关产物植保素——反式白黎芦醇, 这种转基因番茄植株能抗晚疫病。

芪类物质是一种植保素, 它在植物抵抗真菌和细菌感染时起重要作用。研究人员用基因枪法将来源于葡萄中的芪合酶基因 (Vst_1) 转入普通春小麦品种京红 5 号, 从轰击的 2014 块幼胚盾片中获得了 5 个转化植株 (T_0 代), 并从其中 2 株的 T_3 代单株中鉴定出 1 个对白粉病免疫植株和 3 个对白粉病中抗植株。

6. 抗菌肽基因工程 抗菌肽基因转入植物具有明显的抗菌作用。研究人员应用基因枪法将抗菌肽 B 基因导入水稻未成熟胚, 获得了转基因水稻植株。抗性鉴定、斑点杂交、抗菌肽 B 基因 PCR 扩增分析和 Southern 吸印杂交分析结果表明, 选择标记基因和抗菌肽 B 基因都已整合进水稻基因组; Northern 吸印杂交分析还表明, 抗菌肽 B 基因在 mRNA 水平表达。转基因水稻植株增强了对水稻白叶枯病和细条病的抗性。

研究人员用花粉管通道法将柞蚕抗菌肽 D 基因导入番茄, 获得了转基因植株。应用 PCR 技术、DNA 斑点杂交及 Southern 吸印杂交分析表明, 抗菌肽 D 基因已整合到番茄基因组。青枯假单胞菌活体接种结合高发病大田种植试验结果显示, 部分转基因植株的子一代具有较强的抗青枯病能力。

7. 抗除草剂基因工程 抗除草剂基因工程的主要策略如下: 一是将能降解除草剂的酶基因转入植物, 以消除除草剂对作物的危害; 二是修饰除草剂作用的靶蛋白, 使转基因植物对除草剂不敏感; 或者促使这种靶蛋白过量表达, 使转基因植物在吸收除草剂后仍能进行正常代谢。

现已获得了抗草丁膦、磺酰脲、草甘膦等除草剂的转基因植物。

从一种土壤细菌中分离到的 *bar* 基因所编码的草丁膦乙酰转移酶 PAT 可使草丁膦自由氨基乙酰化而对草丁膦解毒。研究人员以 *bar* 基因转化番茄, 获得了对草丁膦有抗性的转基因番茄植株。磺酰脲类除草剂的作用机理是抑制植物体内乙酰乳酸合成酶 (ALS) 的活性, 从而影响支链氨基酸的合成。研究人员将不被磺酰脲类除草剂作用的突变型的 ALS 的基因转入番茄, 获得了抗磺酰脲类除草剂的转基因番茄植株。草甘膦除草剂的作用机理是抑制植物体内 3-烯醇式丙酮酸-磷酸 (EPSP) 合成酶的活性, 从而影响芳香族氨基酸的合成。研究人员从沙门氏菌中分离出突变的 EPSP 合成酶 (第 101 位脯氨酸被丝氨酸取代) 的基因 *Aro*, 以其转化番茄, 获得了抗草甘膦除草剂的转基因番茄植株。

8. 抗低温基因工程 抗冻蛋白一般分为抗冻糖蛋白 (AFGP) 和抗冻多肽 (AFP), 其具有降低生物细胞内溶液凝固点的作用。抗冻蛋白一般存在于美洲黄盖鲈等寒冷水域鱼体内, 而鲑、虹鳟等冷水性经济鱼类缺乏抗冻蛋白。如果给虹鳟注射 AFP, 其抗冻能力就会增强。研究人员将美洲黄盖鲈 AFP 基因注入鲑卵, 获得了转基因鱼。AFP 基因在鲑体内也具有肝脏表达特异性, 但其 mRNA 水平显著低于美洲黄盖鲈, 且鲑只能分泌 AFP 前体, 不能加工为成熟的 AFP, 血液中的水平也显著低于美洲黄盖鲈。研究人员将寒冷水域鱼的 AFP 基因转入鲫鱼, 在转基因鲫鱼血液中检出成熟 AFP, 转基因鲫鱼的耐寒性显著增强。在 0℃ 时, 转基因鲫鱼仍有 33% 存活, 而对照鱼全部死亡。

(二) 改良微生物菌种特性的基因工程

第一个采用基因工程改造的食品微生物为面包酵母。由于把具有优良特性的酶基因转移至该

菌中，因此使该菌含有的麦芽糖透性酶（maltose permease）及麦芽糖酶（maltase）的含量比普通面包酵母高，在面包加工中所产生的二氧化碳气体量也较高，从而制造出膨发性能良好、松软可口的面包产品。这种基因工程改造过的微生物菌种（基因菌）在面包烘焙过程中会被杀死，因此利用其制造面包等食品是安全的。

（三）改良动植物品种质量的基因工程

1. 改良谷物种子贮藏蛋白的基因工程 谷物种子贮藏蛋白可分为四类：白蛋白（albumin），水溶性；球蛋白（globulin），溶于稀盐；醇溶谷蛋白（prolamin）；麦谷蛋白（glutelin），溶于稀酸或稀碱。

除了燕麦和水稻之外，在其他谷物中，醇溶谷蛋白为种子贮藏蛋白的主要部分。醇溶谷蛋白的氨基酸组成很不平衡，它含有约一半的脯氨酸和谷氨酰胺，却只有很少量的赖氨酸和色氨酸。小麦种子贮藏蛋白影响面包的烘烤质量，这主要是由麦醇溶蛋白和麦谷蛋白的含量和性质决定的。

（1）改良种子贮藏蛋白营养品质的基因工程。研究人员发现，大麦突变株系赖氨酸含量高的原因是其第七染色体上的一个单基因发生了突变，这个突变使其赖氨酸含量增加了 30%。赖氨酸含量的增加主要是由于四种富含赖氨酸的蛋白的增加。这四种蛋白是： β -淀粉酶（ β -amylase）、Z 蛋白（protein Z）、胰凝乳蛋白酶抑制剂（chymotrypsin inhibitor）CI-1 和 CI-2。其中，CI-1 和 CI-2 的 cDNA 均已获得。将编码 CI-2 的基因导入烟草后发现，该基因 5' 端上游区域的 4300 或 1100 bp 序列都能使基因组织特异性表达，而 263 bp 的上游序列则不足以使基因组织特异性表达。

研究人员还利用 PCR 技术对水稻谷蛋白基因 Gt_1 最富变化的区域之一加以修饰，使其能编码赖氨酸、色氨酸和甲硫氨酸。此外，将合成的编码高含量必需氨基酸的蛋白质的 DNA（high essential amino acid encoding DNA）HEAAE-II 导入烟草。转基因烟草的叶片中必需氨基酸的含量比对照增加了 150%。

（2）改良种子贮藏蛋白面包烘烤质量的基因工程。麦谷蛋白的高分子量亚基和醇溶蛋白决定面包的烘烤质量。通过对麦谷蛋白高分子量亚基的结构和序列分析发现，高分子量亚基在 N 端和 C 端具有非重复的氨基酸序列，而蛋白质分子的大部分序列是六肽和九肽的重复单位。N 端和 C 端含有 Cys 残基，从而形成分子间二硫键，产生很高分子量的线性聚合物，这些聚合物使得生面团具有较好弹性。上述研究结果提示，可通过两种途径改良面粉的面团弹性：增加麦谷蛋白亚基基因拷贝数来增加其含量；引入具有超量 Cys 残基的高分子亚基来形成高交联的聚合物。

研究人员研究了麦谷蛋白高分子量亚基基因在转基因烟草植株中的表达。将一个具有 2.6 kb 的 5' 端序列和 1.5 kb 的 3' 端序列的编码小麦高分子量 DX_{12} 的克隆片段导入烟草。获得的转基因植株的高分子量亚基蛋白仅在种子中表达，且达到总胚乳蛋白的 0.1%。通过比较高分子量亚基基因启动子和 CaMV 35 S 启动子及谷物其他种子蛋白基因启动子的效果发现，高分子量亚基基因启动子具有非常强的胚乳特异性表达特征。

2. 改良脂肪酸组成的基因工程 自然界中主要的植物脂肪酸有 6~7 种结构，其特点为 16~18 个碳原子链上有 1~3 个双键。在植物脂肪酸合成过程需要多种酶的参与。

（1）增加饱和脂肪酸含量的基因工程。在人类食用消费的油脂中，植物油正在逐渐替代动物

油。大约一半的植物油被加工成人造黄油和制饼糕用的油脂。由于大多数植物油在常温下是液体，因此要将其制成上述固体油脂，就须改变液体油的物理性质。这常通过催化氢化作用以减少双键，从而提高油的熔点来实现。但是，氢化作用将植物油中自然存在的顺式双键转变成反式形式，从营养学角度考虑，这可能是有害的；同时这也增加了油脂的成本。以基因工程技术可提高饱和脂肪酸的含量，从而提高植物油的熔点。具体通过在植物中表达硬脂酰 ACP 脱饱和酶的反义 mRNA 来抑制硬脂酰 ACP 脱饱和酶的活性。研究人员将来自甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 的硬脂酰 ACP 脱饱和酶的反义基因导入油菜后，转基因植株中脱饱和酶的活性及酶本身都几乎检测不到，而种子中硬脂酸的含量提高了 20 倍。

(2) 降低饱和脂肪酸含量的基因工程。在某些情况下，减少植物油中饱和脂肪酸的含量同样是人们所需要的，这对于降低人体中胆固醇的含量是重要的。植物油中虽然饱和脂肪酸的含量比动物脂肪少 40%~50%，但大多数植物油中仍含有 10%~20% 的饱和脂肪酸。运用基因工程技术可降低植物油中饱和脂肪酸的含量。减少饱和脂肪酸的形成可有以下三种途径：增加 3-酮酯酰 ACP 合成酶 II 的水平；减少酯-ACP-硫酯酶的活性；增加具有将饱和脂肪转变为不饱和脂肪功能的膜结合脱饱和酶水平。研究人员将来自海狸的 3-酮酯酰 ACP 合成酶 II 基因导入甘蓝型油菜。该基因在油菜中高效表达，使其种子中的棕榈酸饱和脂肪酸含量降低。将来自大豆的酯-ACP-硫酯酶基因导入大豆，转基因植株的硫酯酶活性降低，饱和脂肪酸的含量降低，表现了基因的共抑制 (co-suppression) 现象。将源于酵母编码膜结合脱饱和酶——硬脂酰 CoA 脱饱和酶 (stearoyl-CoA desaturase) 的基因导入烟草后，转基因植株中饱和脂肪酸的含量下降，不饱和脂肪酸棕榈油酸的含量增加了 7 倍。

3. 增加果实甜度的基因工程 增加番茄甜度基因工程的策略主要如下：一是将酸性转化酶的反义 cDNA 转入番茄中；二是将甜味蛋白基因转入番茄中。

酸性转化酶催化蔗糖分解为葡萄糖和果糖，在蔗糖代谢中起着重要作用。研究人员将酸性转化酶的反义 cDNA 转入番茄中，获得的转基因番茄生长情况与普通番茄相同，但蔗糖的含量增加。富含蔗糖的果实比对照果实小 30%。

另一方面，甜蛋白 (monellin) 甜度高 (至少相当于蔗糖的万倍)，热值低，且食用后不会导致人体内氨基酸失衡，是糖尿病、心血管病等患者很好的糖替代品。研究人员利用果实特异性表达启动子和植物组成型表达启动子构建植物表达载体，将甜蛋白基因转入番茄中，获得了有甜蛋白表达的转基因番茄。

4. 提高果实可溶性固形物含量的基因工程 可溶性固形物含量是加工用番茄等的一个重要指标，是加工制造浓缩番茄等产品的主要参数。当生长中番茄果实的细胞分裂素合成增加时，可使光合产物在果实中的分配增加，从而提高番茄果实可溶性固形物的含量。

研究人员将农杆菌编码的异戊烯转移酶 (*ipt*) 基因与番茄子房壁调节因子 DNA 构建的嵌合基因转入番茄，使 *ipt* 基因在番茄子房中得到了表达。由于异戊烯转移酶参与细胞分裂素的生物合成，因此使细胞分裂素的合成增加，从而使转基因番茄果实增加了可溶性固形物的含量及总产量。

5. 提高果实等器官组织微量元素含量的基因工程 研究人员将带有 CaMV 35 S 启动子与小鼠金属硫蛋白-I 的 cDNA 的嵌合基因，通过根癌农杆菌介导转化枸杞幼茎外植体，经过以含

Zn²⁺ 为特征的选择培养基先后对转化愈伤组织、转化再生芽及转化再生根的筛选培养，得到了完整的转化再生植株。锌离子富集试验、Southern blot、Western blot 等检测结果表明，mMT-I 的 cDNA 已导入枸杞组织并得到表达，转 mMT-I 的 cDNA 的枸杞对锌离子的富集比对照高 2 倍以上。

6. 提高动物生长速度、增加动物营养价值的基因工程 研究人员将草鱼生长激素重组基因 (CAgcGH) 转入鲤鱼，所获得的转基因鱼生长速度提高，饵料转化率高。转生长激素基因鱼体蛋白质含量增加，脂肪、水分含量降低，除甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸和色氨酸外的氨基酸含量均较高，是一种优质食用鱼。我国研制了世界第一尾转基因鱼。现在，在我国将把第一个转基因动物养殖品种，即转 CAgcGH 鲤鱼首先推向市场。

二、基因工程与植物产品贮藏保鲜

在番茄、香蕉、苹果、葡萄、草莓、柑橘、菠萝等贮藏和运输过程中，由于果实成熟过程迅速难以控制，常导致过熟、腐烂，造成巨大经济损失。

多聚半乳糖醛酸酶 (polygalacturonase, PG) 是果实成熟过程中新合成的一种蛋白质。其具降解细胞间果胶质的作用，对于果实软化有很大影响。乙烯在跃变型果实的成熟过程中起着触发呼吸跃变和促进果实成熟的作用。在成熟过程中，乙烯可促进过氧化物酶、过氧化氢酶、果胶酶、纤维素酶等活性增加，并钝化这些酶的抑制物。而 1-氨基环丙烷-羧酸 (aminocyclopropane carboxylic acid, ACC) 是乙烯生物合成的直接前体。

(一) PG 基因工程

研究人员将 PG 基因的一个几乎全长的 cDNA 的 5' 端的 730 bp 片段和一个含有 PG 基因完整开放阅读框架 (open reading frame, ORF) 的 1.6 kb 的 cDNA 片段，构建成反义 PG 基因。再将其分别与 CaMV 35 S 启动子连接重组导入番茄中。含有这两种反义 PG 基因的转基因植株中的 PG mRNA 水平和 PG 活性在果实成熟的各阶段都降低了。然而，转反义 PG 基因番茄在果实成熟过程中 PG 活性的降低并未影响与成熟相关的过程。虽然 PG 活性降低到正常果实的 1%，但是转基因果实在成熟过程中的表现与对照相比并无明显差异。由于果胶酶活性被抑制，因此转基因果实表现出抗裂、抗机械损伤和继发真菌感染的特性，果实的保鲜期也延长了一倍。

研究人员利用 PCR 技术扩增克隆了一个 1.5 kb 长、包含全阅读框架的 PG cDNA，将其反向插入植物转化载体 Bin₁₉ 的 CaMV 35 S 启动子和 Nos 的 3' 端非转译区之间，构建成表达 PG 反义基因的双元载体，经农杆菌与番茄无菌苗子叶外植体共培养进行转化。在所获得的转反义 PG 基因的番茄果实中，PG 的 mRNA 水平及 PG 酶活性在果实成熟阶段明显降低，果实贮存期延长，且不易损伤和感染。

(二) ACC 合成酶基因工程

ACC 合成酶是一种以磷酸吡哆醛为辅基的酶，在乙烯生物合成过程中起关键作用。已从苹果、番茄等许多植物中克隆了 ACC 合成酶基因。被研究的所有植物中都存在一个以上的 ACC 合成酶基因。克隆的所有 ACC 合成酶基因的编码区都具有一定的同源性，其 DNA 序列同源性约 60%，氨基酸序列同源性约 70%。ACC 合成酶基因之间的差异性有利于形成该酶的多种结构和

性质，以适应不同的生理条件。受不同生理条件诱导的不同的 ACC 合成酶基因的 5'端和 3'端非编码区同源性较低，这表明其存在不同的调控机理。

番茄果实成熟期间表达两种 ACC 合成酶，其编码基因分别是 LE-ACC₂ 和 LE-ACC₄。其中，LE-ACC₂ 既与成熟有关，又被创伤诱导。利用 LE-ACC₂ 的 cDNA 构建的反义 RNA 被导入番茄后，几乎完全抑制了上述两个 ACC 合成酶基因 mRNA 的积累。转基因植株的番茄果实内乙烯合成被抑制了 99.5%，叶绿素降低，番茄红素合成也都被抑制。果实成熟启动延迟，不能自然成熟，不变红，不变软。但是在用外源乙烯处理后，上述抑制可被解除。外源乙烯处理催熟的果实与自然成熟的果实在色、香、味及抗压性等方面均无显著差异。这表明通过反义 RNA 技术来抑制 ACC 合成酶活性，可抑制乙烯的生物合成，从而培育出果实耐贮运的新品种。

研究人员利用 RT-PCR 技术克隆了 ACC 合成酶多基因家族成员之一 LE-ACC₂ 编码区约 1.7 kb 的 cDNA，经酶切图谱和序列分析鉴定无误后，反向插入到植物表达载体 pBin₄₃₇ 中，构建了表达 ACC 合成酶反义 RNA 的二元载体。经农杆菌介导转化番茄“丽春”品种后，通过 PCR 检测从抗卡那霉素再生植株中筛选到 6 株转基因植株。Southern 杂交确证了外源基因以单拷贝插入番茄染色体中；对果实乙烯释放的测定结果表明，转基因番茄果实的乙烯释放量仅为对照的 30% 左右；在室温下转基因番茄果实采后保存 60d 以上仍然没有变红、软化。以上结果表明，ACC 合成酶基因反义 RNA 在转基因番茄中的表达能有效地抑制乙烯的生物合成，从而延缓果实成熟，使转基因果实表现出良好的耐储保鲜特性。对转基因植株子一代 (T₁) 的分析结果进一步表明，反义 ACC 合成酶基因以典型的单基因方式传到子代。通过对子二代的分析已初步筛选到一个耐储藏的转基因番茄纯合品系。

(三) 乙烯形成酶基因工程

乙烯形成酶 (EFE)，即 ACC 氧化酶，是乙烯生物合成途径中的最后一个酶，催化 ACC 向乙烯转化。EFE 对底物具有高度的立体专一性。一般组织中的 EFE 是固有的，不是乙烯合成的限速酶。EFE 可有多种同工酶，其编码的基因为多基因家族。

EFE 的 cDNA 已从番茄、苹果等多种不同植物中分离获得。其氨基酸的同源性高达 90%。用 EFE 反义 RNA 可抑制 EFE 的活性。在纯合的转基因番茄果实中，乙烯的形成被抑制了 97%。其果实着色时间与正常果实基本相同，但速度变慢。转基因延熟番茄在室温下可贮藏 45d，比对照果实更耐过熟和皱缩。而 PG mRNA 水平及其他酶的活性与对照没有差异。当用外源乙烯处理时，果实的成熟与对照组相同。

(四) ACC 脱氨酶基因工程

ACC 在植物体内除生成乙烯外，还可在丙二酰转移酶的作用下生成丙二酰 ACC。丙二酰转移酶与乙烯的生物合成调节相关。

细菌来源的 ACC 脱氨酶能降解乙烯的直接前体 ACC，从而抑制植物体内乙烯的合成。研究人员从土壤中分离到了一些能降解 ACC 的假单胞菌。这些细菌具有 ACC 脱氨酶。该酶能将 ACC 降解为丁酮酸和氨。这两者都是植物体内的正常代谢物。将 ACC 脱氨酶基因置于 CaMV 35 S 启动子调控之下，然后用于转化番茄，获得了许多果实成熟过程变慢但其他表现正常的转基因番茄。该基因的高效表达减少了 90%~97% 的乙烯生成。转基因果实的成熟期被明显推迟，比正常对照果实能更长时间（延长 6 周）保持相同硬度。但当用外源乙烯处理转基因果实时，其成熟

正常。

研究人员用 PCR 技术从假单胞菌中克隆到 ACC 脱氨酶基因，并通过农杆菌介导将其转入番茄中。转基因再生植株经 Southern blot 检测证明，ACC 脱氨酶基因已整合到番茄基因组中并稳定表达。转基因番茄果实成熟期的推迟时间与其体内乙烯的抑制程度有相关性。转基因番茄植株乙烯的合成降低 80% 左右，转基因番茄果实离体条件下可保鲜 75d 左右。

三、基因工程与食品新资源的开发

非洲有一种应乐果 (*Dioscoreophyllum cumminsii*) 的果实中含有一种甜味蛋白——应乐果蛋白 (monellin)。研究结果表明，其甜度相当于蔗糖的数万倍，热值低，且食用后不会导致人体内氨基酸的失衡。因此，其可开发为食品饮料工业理想的甜味剂。

monellin 由两条多肽链组成，但该天然甜味蛋白在热或酸的条件会丧失甜味。研究人员人工改造、合成了其编码基因。该修饰基因的产物为一条肽链而非天然的两条肽链，然而其甜度与天然形式相当，且更稳定，并无毒性。将该人工合成基因分别与组成型表达启动子 CaMV 35 S 和特异性表达启动子 E_8 (在番茄开始成熟时于果实中表达) 重组，然后导入番茄和莴苣中。在所获得的转基因植株各种组织中均有 monellin 的表达。用外源乙烯处理能提高以 E_8 为启动子的 monellin 编码基因的表达。

主要参考文献

- [1] [美] 萨姆布鲁克, J., 弗里奇, E. F., 曼尼阿蒂斯, T. 著. 金冬雁, 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996
- [2] [美] 奥斯伯, F. 金斯顿, R. E., 塞德曼, J. G., 斯特拉尔, K., 布伦特, R., 穆尔, D. D., 史密斯, J. A. 著. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998
- [3] 黄翠芬. 遗传工程理论与方法. 北京: 科学出版社, 1987
- [4] 蔡良琬. 核酸研究技术. 下册. 北京: 科学出版社, 1990
- [5] 齐义鹏. 基因及其操作原理. 武汉: 武汉大学出版社, 1998
- [6] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术. 北京: 科学出版社, 1998
- [7] 邱泽生. 基因工程. 北京: 首都师范大学出版社, 1993
- [8] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999
- [9] 林万明, 杨瑞馥, 黄尚志, 秦鄂德. PCR 技术操作和应用指南. 北京: 人民军医出版社, 1993
- [10] 姜军平. 实用 PCR 基因诊断技术. 北京, 广州, 上海, 西安: 世界图书出版公司, 1996
- [11] Gibson S, Somerville C. 著. 翟桢译. 分离植物基因. 生物技术通报. 1994, (2): 6~9
- [12] 史济平. 分子生物学基础. 北京: 人民卫生出版社, 2000
- [13] 吴刚, 崔海瑞, 舒庆尧, 夏英武. Bt 杀虫晶体蛋白基因及其转基因育种研究进展. 生物工程进展. 2000, 20 (2): 45~48
- [14] Rhim S-L, Cho H. J. Development of Insect Resistance in Tomato Plants Expression the δ -endotoxin Gene of

- Bacillus thuringiensis* subsp *tenebrionis*. Mol Breed, 1995, 1 (3): 229~236
- [15] 吴昌银, 叶志彪, 李汉霞, 唐克轩. 雪花莲外源凝集素基因转化番茄. 植物学报. 2000, 42 (7): 719~723
- [16] 王慧中, 赵培洁, 周晓云. 转 WMV-2 CP 基因黄瓜植株的再生. 植物生理学报. 2000, 26 (3): 267~272
- [17] Whitham S, Mc Cormick S, Baker B. The N Gene of Tobacco Confers Resistance to Tobacco Mosaic Virus in Transgenic Tomato. Proc Natl Acad Sci, USA. 1996, 93 (16): 8776~8781
- [18] 程英豪, 吴光, 王继伟等. 表达黄瓜花叶病毒外壳蛋白的转基因番茄抗黄瓜花叶病毒浸染. 植物学报. 1997, 39 (1): 16~31
- [19] 赵淑珍, 王昕, 王革娇等. 由卫星互补 DNA 单体和双体基因构建的抗黄瓜花叶病毒的转基因番茄. 中国科学 (B 辑). 1990, (7): 706~713
- [20] Kunik J, Gafni Y, Citovsky W. Transgenic Tomato Plants Expressing TYLCV Capid Protein Are Resistant to the virus. The Role of the Nuclear Localization Signal (NLS) in the Resistance. Acta Horti, 1997, 447: 387~391
- [21] Ultzen T, Gielen J, Venenca F, et al. Resistance to Tomato Spotted with Virus in Transgenic Tomato Hybrids. Euphtica, 1995, 85 (1-3): 159~168
- [22] 陈谷, 叶长明, 黄俊潮, 李宝健. 番木瓜环斑病毒复制酶基因转化番木瓜的研究. 遗传. 1998, 20 (增刊): 9~11
- [23] 蓝海燕, 王长海, 张丽华, 刘桂珍, 王岚兰, 陈正华, 田颖川. 导入 β -1, 3 葡聚糖酶及几丁质酶基因的转基因可育油菜及其抗菌核病的研究. 生物工程学报. 2000, 16 (2): 142~146
- [24] Thomzik J. Z, Stenzel K, Stocker R. Synthesis of a Grapevine Phytoalexin in Transgenic Tomatos (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Conditions Resistance against *Phytophthora infestans*. Physiol Mol Plant Pathol, 1997, 51 (4): 265~270
- [25] 梁辉, 郑近, 段霞瑜, 盛宝钦, 贾双娥, 李义文, 唐顺学, 欧阳俊闻, 李家洋, 李良材, 田文忠, 贾旭. 用基因枪法获得抗白粉病转芪合酶基因小麦. 科学通报. 1999, 44 (24): 2644~2648
- [26] 黄大年, 朱冰, 田文忠等. 中国科学 (C 辑). 1997, 27 (1): 55~62
- [27] 田长恩, 王正询, 陈韬, 周玉萍, 黄自然, 黄亚东. 抗菌肽 D 基因导入番茄及转基因植株的鉴定. 遗传. 2000, 22 (2): 86~89
- [28] De Block M, Botterman J, Vandewiele M, et al. Engineering Herbicide Resistance in Plants by Expression of a Detoxifying Enzyme. EMBO J. 1987, 6 (9): 2513~2518
- [29] Benbook C. Herbicide Resistance: Environmental and Economic Tissues. Proc Bio Expo Butterworth Boston. 1986, (86): 27~34
- [30] Fillatti JJ, Haissig B, Mccown B, et al. Development of Glyphosate Tolerant Populus Plants through Expression of a Mutant Aroa Gene from Salmonella Typhimurium. Basic Life Sci. 1988, 44: 243~249
- [31] Gong Z, Hew C. L. Transgenic Fish in Aquaculture and Developmental Biology. Current Topics in Developmental Biology, Academic Press. 1995, 30: 177~214
- [32] 赵浩斌, 陈尚萍, 朱作言. 转基因鱼的研究进展. 农业生物技术学报. 1999, 7 (3): 301~306
- [33] Klann E. M, Hall B, Bennett A. B. Antisense Acid Invertase (TIV1) Gene Alters Soluble Sugar Composition and Size in Tomato Fruit. Plant Physiol. 1996, 112 (3): 1321~1330
- [34] Penarrubia L, Kim R, James G. Production of the Sweet Protein Monellin in Transgenic Plants. Bio/Technology. 1992, 10: 561~564
- [35] Martineau B, Adams D. F, Deverna J. W. Ovary Predominant Expression of a Cytokinin Biosynthetic Gene in Tomato Results in Higher Total and Soluable Fruit Solids. Proc Plant Growth Regul Soc Am. 1994, 21: 15~24
- [36] 赵亚华, 何平, 高向阳. 根癌农杆菌介导的 mMT-I cDNA 转化枸杞及其表达的研究. 中国农业科学. 2000, 33 (2): 92~97

- [37] 朱作言, 曾志强. 转基因鱼离市场还有多远. 生物技术通报. 2000, (1): 1~6
- [38] 叶志彪, 李汉霞, 周国林. 番茄多聚半乳糖醛酸反义 cDNA 克隆的遗传转化与转基因植株再生. 园艺学报. 1994, 21 (3): 305~308
- [39] 刘传银, 田颖川, 沈全光, 蒋浩, 鞠戎, 阎田, 刘存德, 莽克强. 番茄 ACC 合成酶 cDNA 克隆及其对果实成熟的反义抑制. 生物工程学报. 1998, 14 (2): 139~146
- [40] 叶志彪, 李汉霞, 刘勋年. 利用转基因技术育成耐贮藏番茄——华番 1 号. 中国蔬菜. 1999, (1): 6~10
- [41] 宋俊岐, 邱并生, 王荣, 贺焰, 赵长生, 田波. 通过表达 ACC 脱氨酶基因控制番茄果实的成熟. 生物工程学报. 1998, 14 (1): 33~38

发酵工程原理及其在食品工业中的应用

第一节 概 述

一、发酵工程的定义

发酵工程，既是生物工程的一个分支，也是食品工程的组成部分，它起源于传统的发酵食品。发酵（fermentation）这个英文术语起源于拉丁语 *fervere*，意为“发泡”、“沸涌”，指酵母作用于果汁或发芽的谷物，进行酒精发酵时起泡，即糖无氧代谢产生二氧化碳（ CO_2 ）的现象。随后，巴斯德探讨了酵母酒精发酵的生理意义，认为发酵是酵母在无氧状态下的呼吸过程，并阐明了和呼吸一样是生物获得能量的一种形式。对典型的厌氧发酵，可定义为“发酵是供给能源的氧化-还原反应”。更明确地说，发酵是供能的氧化还原反应，有机物起着供氧体和受氧体两方面的作用，既是电子供体，又是电子受体。对需氧发酵，可定义为：“有机化合物借助于分子态氧而受到不完全氧化的反应。”从这一点上，巴斯德的基本认识依然是正确的，即呼吸和发酵均可统一理解为生物为获得能量所进行的氧化还原反应。目前，人们把借助微生物在有氧或无氧条件下的生命活动来制备微生物菌体本身，或其直接代谢产物或次级代谢产物的过程统称为发酵。所谓发酵工程，就是直接利用微生物的机能将物料加工以提供产品或为社会服务的技术。发酵工程又称为微生物工程，它是生物技术走向产业化的必经之路，它的主要研究对象是微生物发酵过程中有普遍性意义的工程技术问题，如大规模微生物细胞培养过程、大规模培养基灭菌和空气灭菌过程、微生物细胞生长和产物形成动力学、发酵过程的优化、生物反应器的放大和设计、发酵过程的参数监控和计算机应用、发酵产品的分离和纯化等工程技术问题。随着科学技术的突飞猛进，各学科的相互交叉，相互渗透，给予了发酵工程这门有悠久历史的技术更新的内涵，归纳起来有三个特点：①发酵工程是一门多学科、综合性的科学技术；②反应中需要有生物催化剂的参与；③其最终目的是建立工业生产过程或进行社会服务。

二、发酵工程的发展简史

食品工业的发展与发酵技术的进步密切相关，早在公元前二千年甚至六七千年前，我国人民就已经利用微生物进行酿酒。古埃及人也开始制造啤酒。但是作为发酵工业却是近百年才发展起来的。它的发展大致经历了以下几个阶段。

（一）天然发酵阶段

从史前至 19 世纪末，在微生物的性质尚未被人们认识时，人类已经利用自然接种方法进行发酵食品的生产。主要产品有黄酒、白酒、啤酒、酒精、醋、干酪等。当时，实际上还谈不上发酵工业，而仅仅是家庭式或作坊式的手工业生产。多数产品为厌氧发酵、非纯种培养、凭经验传授技术和产品质量不稳定是这个阶段的特点。

（二）纯培养技术的建立

在巴斯德卓越的工作之后，微生物学发展史上的又一奠基人科赫建立了微生物分离纯化和纯培养技术，人类开始了人为地控制微生物的发酵进程，从而使发酵生产技术得到巨大的改良，提高了产品的稳定性，这对发酵工业起了巨大的推动作用。由于采用纯种培养与无菌操作技术，包括灭菌和使用密闭式发酵罐，使发酵过程避免了杂菌污染，生产规模扩大，产品质量提高。特别是在第一次世界大战中，由于战争的需要，促使丙酮、丁醇和甘油等工业飞快发展，由此不仅建立起真正的发酵工业，并逐渐成为化学工业的一个部分。此外，由于酵母生产日益扩大，发酵过程中供氧不足，导致菌体生产受影响和乙醇的积累，开始出现了补料发酵及设有空气分布的发酵罐，因此可以认为，纯培养技术的建立是发酵技术发展的第一个转折时期。

（三）通气搅拌发酵技术的建立

青霉素的问世，给人类医疗保健事业做出了巨大贡献，同时翻开了发酵工业发展史的崭新一页。由抗生素发酵开始发展起来的通气搅拌液体发酵技术是现代发酵工业最主要的生产方式，它使需氧菌的发酵生产从此走上大规模工业化的生产途径，并且逐步形成和建立了生化工程学科。与此同时，也有力地促进了菌体转化、微生物酶与氨基酸发酵工业的迅速发展。因而可认为，通气搅拌发酵技术的建立是发酵工业上的第二个转折点。

（四）代谢控制发酵技术

随着生物化学、微生物生理学以及遗传学的深入发展，对微生物代谢途径和氨基酸生物合成的研究和了解的加深，人类开始利用调控代谢的手段进行微生物选育和控制发酵条件。1956 年日本首先成功地利用自然界存在野生的生物缺陷型菌株进行谷氨酸发酵生产。此后，赖氨酸、苏氨酸等许多氨基酸都采用发酵法生产。显然，利用微生物生产氨基酸是以代谢调控为基础的新的发酵技术，它是根据氨基酸生物合成途径，用遗传育种方法进行微生物人工诱变，选育出某些营养缺陷株或抗代谢类似物的菌株在营养条件进行控制的情况下发酵生产，大量积累人们预期的氨基酸。由氨基酸发酵而开始的代谢控制发酵，使发酵工业进入一个新的阶段。随后，核苷酸、抗生素以及有机酸等方面也利用代谢调控技术进入发酵生产。

（五）开拓发酵原料时期

传统的发酵原料主要是粮食、农副产品等糖质原料，随着饲料酵母及其他单细胞蛋白的需要日益增多，急需开拓和寻找新的原料。石油化工副产物石蜡、醋酸、甲醇以及甲烷等碳氢化合物被用来作为发酵原料，从而开始了所谓石油发酵时期。由于利用碳氢化合物大规模生产单细胞蛋白，使发酵罐的容量发展到前所未有的规模，ICI 公司连续的压力循环发酵罐达 $3\ 000\text{m}^3$ 。同时以碳氢化合物为原料在发酵时氧耗大，这就给发酵设备带来新的要求，发展了循环式、喷射式等多种发酵罐，并用计算机控制进行灭菌、控制发酵 pH 和应用氧电极等措施，使发酵生产朝自动控制前进了一大步。

(六) 基因工程阶段

20 世纪 70 年代开始, 由于 DNA 体外重组技术的建立, 发酵工业又进入一个崭新的阶段, 这就是以基因工程为中心的生物工程时代。基因工程是采用酶学的方法, 将不同来源的 DNA 进行体外重组, 再把重组 DNA 设法转入受体细胞内, 并进行繁殖和遗传下去。这样, 人们就能够根据自己的意愿将微生物以外的基因构件导入微生物细胞内, 从而达到定向地改变生物性状和功能并创造新的“物种”, 使发酵工业能够生产出自然界微生物所不能合成的产物。大大地拓宽了发酵工业的范围, 使发酵工业发生革命性变化。

表 3-1 工业发酵的发展历史

时 间	发酵阶段	主 要 产 品	主 要 技 术
古代—1900	天然发酵	酒、醋、酵母、干酪	天然接种, 分批培养
1905—	纯 培 养	酒精、丙酮丁醇	密闭纯培养
1940—	通气搅拌	抗生素、有机酸、维生素	通气搅拌发酵罐, 连续发酵
1957—	代谢控制	氨基酸、核苷酸	选育代谢调节和缺陷生产菌株
1960—	开拓原料	单细胞蛋白	采用石蜡等原料 3 000m ³ 连续发酵
1979—	基因工程	胰岛素、干扰素、生理活性物质等	DNA 重组菌株

近年来生物技术发展迅猛, 发酵技术在食品工业中的应用越来越广, 例如, 利用优选微生物菌种, 已经能够生产出门类众多的发酵食品, 主要包括饮料酒(啤酒、葡萄酒等果酒、黄酒、白酒、白兰地、威士忌、奶酒等)、酱、酱油、醋、乳酪、酸奶等。随着微生物发酵技术的发展, 新型高效发酵设备和现代信息控制技术等对传统的发酵工业的改造, 发酵食品的品种还将不断增加, 质量不断提高, 产量不断增加。随着“回归大自然”的呼声的高涨, 人们越来越重视采用微生物发酵方法和酶法转化法生产食品添加剂、功能食品及配料, 如低聚糖、糖醇、活性多肽、海藻糖、真菌多糖、蛋白质和对人体健康有益的活菌制品等。此外, 作为保健食品重要基料的多不饱和脂肪酸, 如 DHA 和 EPA (原来从鱼油中提取)、 γ -亚麻酸 (原来从植物月见草中提取)、虾青素 (原来从虾壳中提取) 等, 现在可以用培养真菌或藻类来生产, 产量大大提高, 成本明显下降。利用发酵方法生产的微生物酶制剂, 如淀粉酶、糖化酶和葡萄异构酶用于食品加工, 可生产葡萄糖、麦芽糖和果葡糖浆等淀粉糖, 还可以代替酒曲和麦芽酿酒; 果胶酶可用于果汁加工, 提高出汁率, 改善澄清效果, 加快过滤速度; 乳糖酶可用于分解牛奶中的乳糖; 脂肪酶可以用于改进食品的风味; 蛋白酶可用于制造蛋白胨、多肽、氨基酸, 还可以用于嫩化肉类、改善焙烤食品的品质等; 柚苷酶可除去柑橘果汁的苦味; α -乙酰乳酸脱羧酶可以有效地降低啤酒中的双乙酰含量, 加快啤酒的成熟。利用基因工程和蛋白质工程可以设计出新酶种, 以适应食品工业的新的需求。利用糖质原料, 经过微生物发酵生产 L-乳酸、 β -羟基丁酸, 再聚合制备可降解的食品包装材料。另外, 食品加工副产物的深加工和废弃物的处理, 也都可以利用微生物发酵技术。

三、发酵工艺及方法简介

发酵是利用微生物体的代谢作用并借助于对代谢过程的控制来获得所需产品的过程。它包括了微生物菌种的纯种分离、选育、活化和扩大培养, 培养基的配制, 培养基和空气的灭菌或除

菌，发酵工艺的控制，细胞的大规模培养，产物的分离纯化和生产工艺的设计等内容。典型的微生物发酵工艺流程图见图 3-1。微生物的发酵方法可以分为固体发酵法和液体发酵法两大类。

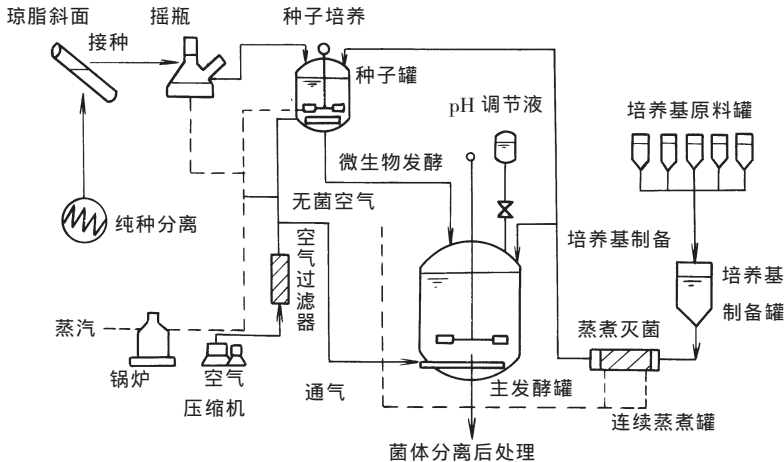


图 3-1 典型的微生物发酵工艺流程图

（一）固体发酵法

固体发酵法是很古老的发酵方法，从远古时代人们就已利用固体发酵制造食品、干酪和酿酒。该法是利用固体基质，如高粱、大麦、小麦、麸皮、米糠、秸秆等为主要原料，再根据需要添加其他谷糠、豆饼、无机盐等，加水拌成含水量适度的半固态物料作为培养基，供作微生物的生长繁殖和产生代谢产物。随着世界能源危机的出现和环保意识的加强，古老的固态发酵方法又重新引起人们的兴趣。目前利用固体发酵法生产的产品有酒曲、白酒、酱油、食醋、腐乳、酶制剂、食用菌、发酵饲料、生物农药等。

固体发酵与液体（深层）发酵相比，具有以下优点：①固体发酵时培养基水活度较低，对霉菌影响较小，多数酶蛋白属于次级代谢产物，通常是在霉菌分化时形成，液体发酵抑制真菌分化，所以固体发酵单位体积的酶产量往往高于液体发酵几倍，甚至几十倍，特别适合真菌酶类和一些次级代谢产物及一些大型真菌的生产。②操作简单，适应性强，原料来源广，价格低廉，可以利用很多种其他发酵工艺无法利用的粮食加工下脚料或废料进行生产。③固体发酵仅需空气自然对流或小量通风即可，能耗低。④固体发酵的产物提取一般步骤少，费用也省。有些产物，如饲料或饲料添加剂，不需要分离步骤，全部发酵物质可以作为产品。⑤发酵工艺全过程无废水或很少，可以减少环境污染。

固体发酵尽管是一门具有悠久历史的发酵技术，但因其具有简单易行、投资省、经济合理、污染少等特点，近年来又重新受到国际学术界和产业界的高度重视，在制造酶制剂、菌肥、发酵饲料、饲料添加剂、食品添加剂以及一些东方发酵食品中广泛采用。

（二）液体发酵法

液体发酵法的工艺特点是利用液态培养基，进行微生物的生长繁殖和形成人们所需要的代谢产物。根据通气（供氧）或不通气及通气方法的不同，又分为液体表面发酵法、液体深层通气发酵法、液体厌氧发酵法三种。其中，液体深层通气发酵法是现代发酵工业普遍采用的方法，我国

抗生素发酵、有机酸发酵、氨基酸和核酸类化合物发酵、维生素发酵、酶制剂发酵和许多功能性发酵食品均采用此法。

1. 液体表面发酵法 液体表面发酵法又称液体浅盘发酵法或静置培养法，系将已灭菌的液体培养基，接入微生物菌种后，装入可密闭的发酵箱内盘架上的浅盘中，薄薄一层，液层厚约1~2cm，然后向盘架间通入无菌空气，通过浅盘内培养基的表面供给氧气，并维持一定的温度进行发酵。用此法发酵无须搅拌，动力消耗省，但培养基的灭菌须在另外设备中进行。缺点是控制杂菌污染较难，所需场地较大，劳动强度大，生产效率低。

2. 液体深层通气发酵法 本法是发酵工业最广泛应用的方法，所用主要设备发酵罐是一个具有可以有或没有通气系统的密闭容器。发酵罐的容量大，在酶制剂和制药生产中目前多采用20~50m³，但谷氨酸生产罐已达480 m³。有关液体通气发酵的操作技术问题，将在下几节中分别讨论。

3. 液体厌氧发酵法 迄今为止，能作大规模液体培养的厌氧菌仅局限于 *Clostridium acetobutylicum* (丙酮丁醇梭菌)的丙酮丁醇发酵一种。由于该菌是严格厌氧菌，故不但可省略通气和搅拌设备，简化工艺过程，还能大大节约能源的消耗。酒精、啤酒、葡萄酒、酸乳的发酵属于兼性厌氧发酵，菌种培养时需要适量通气，发酵时则不通气。由于厌氧发酵罐不必安装通气和搅拌装置，所以其体积一般可明显大于有通气和搅拌设备的发酵罐，从而提高了生产效率。此外，还有利于推行连续发酵作业。

综上所述，固体厚层通气发酵法与液体深层通气发酵法相比各有其利弊。固体发酵法易受杂菌污染，因此产品的纯度较差，固态原料的利用率较低；又因固体发酵的条件控制不易均匀，所产的质量就难稳定，生产劳动强度也大，占用场地也多。不过固体发酵具有设备简单、投资少、钢材用量少等优点。液体深层通气发酵法的液态培养基的流动性大，对工艺条件（如温度、溶氧、pH、营养成分等）的控制就较容易，有利于自动控制；同时由于在密闭的发酵罐内纯种发酵，因而产品纯度高，质量也较稳定，还具有机械化程度高、劳动强度小、设备利用率高等优点。而液体表面发酵法实际上已被淘汰。总之，究竟采用何法恰当，要根据所用菌种，所生产的产品和设备的供应等具体条件而定。

第二节 培养基的组成及制备

一、培养基的类型

培养基是一种人工配制的、供微生物生长繁殖和形成代谢产物用的营养物质，可按对培养基的成分了解、外观的物理状态和用途进行分类。

(一) 按对培养基的成分了解分类

培养基按组成物质的成分可分为合成培养基和天然培养基两类。前者所用的原料的化学成分明确、稳定，适用于研究菌种基本代谢和过程的物质变化，但是生产某些疫苗等生物制品的过程中，为了防止异性蛋白等其他杂质混入，也常用合成培养基。合成培养基的营养单一且价格昂贵，故不适用于大规模生产。发酵工业普遍使用天然培养基，它的原料是一些天然的动植物产

品,相对于合成培养基来说,其成分比较复杂,如玉米粉、花生粉、豆饼粉、蛋白胨等。天然培养基的特点是营养丰富,适合于微生物的生长繁殖和目的产物的合成。一般天然培养基中不需要另加微量元素、维生素等物质,且培养基组成的原料来源丰富、价格低廉,适合于工业生产。但由于天然培养基的组分复杂,不同产地、不同季节、不同品种的相同原料,各种成分含量有所不同,不易重复,故若对原料质量等方面不加控制会严重影响生产的稳定性。

(二) 按培养基外观的物理状态分类

培养基按状态分,可分为固体培养基、半固体培养基和液体培养基。固体培养基比较适用于菌种的分离和保存,也广泛应用于曲霉菌和有子实体的真菌类,如香菇、木耳、灵芝等的生产。固体培养基的主要成分为麸皮、大米、小米、木屑、稻糠和琼脂等,有的还含有一些其他营养成分。半固体培养基即在配好的液体培养基中加入琼脂,一般用量为0.5%~0.8%,培养基即呈半固体状态,主要用于鉴定菌种、观察细菌运动特征及噬菌体的效价测定等。液体培养基中的80%~90%是水,其中配有可溶性的或不溶性的营养成分,它流动好,输送方便,有利于氧气、其他物质和热量的传递,便于发酵参数的控制,是摇瓶发酵和大规模工业发酵最常用的培养基。

(三) 按用途分类

培养基按其用途一般可分为斜面培养基、种子培养基和发酵培养三种。

斜面培养基是供菌种繁殖的一种常用的固体培养基。这种培养基的要求是能使菌体迅速生长,并不易引起菌种发生变异。

种子培养基是供微生物大量生长,为发酵提供活力强的种子。种子培养基的配制原则是使种子生长旺盛,各种有关的初级代谢酶的活力高,有利于接入发酵培养基后大量、快速合成产物。种子培养基一般要求营养丰富而全面的有机氮源和维生素的比例较高。

发酵培养基是供菌种生长、繁殖,得到我们需要的目标产物用,既要使种子接种后能迅速生长达到一定的菌体浓度,又要使长好的菌体能迅速合成所需的产物。因此,发酵培养基的组成除有菌体生长所必需的碳源、氮源、磷源等外,还要有产物合成所需的某些特定元素、前体和促进剂等。

二、培养基的配制原则

各种微生物所需的营养物质可归为五类:水、碳源、氮源、无机盐和生长因子,如果为好氧型微生物,还需要氧气。不同的微生物,在不同的生长时期及不同的使用目的,对培养基要求也不同。应根据具体情况,从微生物营养特点及生产工艺要求出发,选择合适的培养基,以达到稳产、高产的目的,同时也要符合增产节约、因地制宜的原则。

(一) 根据不同微生物的营养需要配制不同的培养基

不同的微生物所需营养物质不同,其培养基配方也不同。所以,必须了解不同生产菌种的培养条件、代谢途径、代谢产物的化学性质,从而确定最优的培养基。

(二) 合适的碳氮比

培养基中碳氮比对微生物生长繁殖和产物合成的影响极为明显。氮源过多,会使菌体生长过

于旺盛，pH 偏高，不利于代谢产物的积累；氮源不足，则菌体繁殖量少，从而影响产量。碳源过多，则容易形成较低的 pH，不利于菌体的生长；若碳源不足则易引起菌体衰老和自溶。另外，碳氮比不当还会影响菌体按比例地吸收营养物质，直接影响菌体的生长和产物的形成。

微生物在不同的生长阶段，对碳氮比的最适要求也不一样。一般来讲，因为碳源既作为碳架参与菌体和产物合成又作为菌体生长和代谢过程的能源，所以其比例要比氮源高。一般工业发酵培养基的碳氮比约为 100:0.2~2.0。但在谷氨酸等含氮产物发酵中，因为产物中含氮多，所以碳氮比就要相对低些，例如在发酵生产谷氨酸时应取碳氮比为 100:15~21，若碳氮比为 100:0.5~2.0 则出现只长菌体而几乎不合成谷氨酸的现象。应该指出的是，碳氮比也随碳水化合物及氮源的种类以及通气搅拌等条件而异，因此很难确定一个统一的比值。

碳源有快速利用的碳源和慢速利用的碳源之分。前者能迅速参与菌体生长代谢和产生能量，因此适于长菌。后者为菌体缓慢利用，有利于延长代谢产物的合成。发酵过程中采用混合碳源往往可以起到提高生产率的作用。据报道，采用葡萄糖和醋酸混合碳源比单一葡萄糖为碳源的发酵谷氨酸对糖转化率提高 30%。即使是全部为糖类原料也可选用不同种糖类混合使用，既可用部分降低原料成本又能提高产量。

氮源有无机氮源和有机氮源两类，同样也有快速利用氮源（如硫酸铵）和慢速利用氮源（如黄豆粉、花生粉）之分。快速氮源容易被菌体利用来生长，对某些产物的合成，特别是抗生素的合成有调节作用。慢速氮源对延长次级代谢产物的分泌期和提高产物产量有一定好处。

（三）合适的 pH

各种微生物正常生长所需的 pH 均不同，一般来说，霉菌和酵母菌生长最适微酸性环境，放线菌和细菌则适于中性和微碱性的环境中生长。在配制培养基时，要注意生理碱性物质，以及 pH 缓冲剂的加入和搭配。要根据菌种的性能、其生长和合成产物时 pH 的变化情况以及最适 pH 控制范围等，综合考虑选用何种生理酸碱物质及其用量，从而保证在整个发酵过程中 pH 都能维持在最佳状态；也可考虑用中间补料来控制 pH。

（四）合适的渗透压

配制培养基时，应注意营养物质要有合适的浓度。营养物质浓度过低，不利于菌体的生长，也不利于提高产物的产量和设备利用率。但是，营养物质浓度过高，则由于培养基溶液的渗透压太大，会抑制微生物的生长，也不利于溶氧。同时培养基中的离子浓度也会影响微生物的生长及代谢，因此，培养基中各种离子浓度的比率需要平衡。在不影响微生物生理特性和代谢转化率的情况下，通常趋向于高浓度发酵，以提高生产率和设备利用率。

（五）合适的氧化还原电位

大多数微生物能适应的氧化还原电位范围较广，所以氧化还原电位对微生物的影响不大。但是，对于专性厌氧细菌，由于自由氧的存在对其有毒害作用，因而在配制培养基时往往需要加入还原剂以降低氧化还原电位。

配制培养基应遵循以上基本原则，同时在发酵工业中，还要注意生产成本问题，尽可能使用廉价原料来配制培养基，使之尽可能满足以下条件：每克消耗的底物将产生最大的菌体得率或产物得率，得到最高的产物合成速率，最大限度减少副产品的生成，原料来源丰富、供应充足、价廉物美，不增加通气搅拌及后期产物的提取和纯化的难度。

三、发酵工业中常用的原料

发酵工业中常用的原料主要有玉米粉、大米、淀粉、糖蜜、油脂等均为良好碳源，尿素、玉米浆、硫酸铵、氨、硝酸盐等均为良好氮源。

(一) 工业上常用碳源

碳源是培养基主要成分之一。其功能有两个，一是作为合成菌体和目的产物的碳成分；二是为微生物菌种的生长繁殖提供能源。在微生物发酵过程中，目前使用最广的碳源是淀粉，主要来自玉米、谷物、木薯等，还可以用经水解得到的各种淀粉糖，如葡萄糖、麦芽糖等。使用最多的是葡萄糖，另外还有蔗糖、乳糖等。用于疫苗、一些基因工程产品生产的培养基，通常采用牛血清蛋白、牛肉汁、酵母粉等作为碳源。

表 3-2 工业上常用的碳源及其来源

碳 源	来 源
葡萄糖	纯葡萄糖、水解淀粉
乳 糖	纯乳糖、乳清粉
淀 粉	玉米、大米、木薯、甘薯、大麦等
蔗 糖	甜菜糖蜜、甘蔗糖蜜、粗红糖、精白糖等

(二) 工业上常用氮源

氮源是构成微生物细胞和含氮代谢产物的营养物质。它是微生物发酵中的主要原料之一。常用的氮源有无机氮源和有机氮源。氨水、硫酸铵、硝酸铵等为无机氮源；黄豆粉、花生粉、酵母粉、鱼粉等都是有机氮源。一般来说，有机氮源更有利于微生物的生长。表 3-4 为工业上的常用的有机氮源及含氮量。

表 3-3 工业上常用几种农副产品和淀粉质原料成分 (%)

原料名称	水分	粗淀粉	粗蛋白	粗脂肪	粗纤维	灰分
甘薯干	12.9	76.6	6.1	0.5	1.4	2.4
玉米	12.0	73.0	8.5	4.3	1.3	1.7
麸皮	12.1	55.4	13.5	3.8	10.4	4.8
米糠	11.5	38.5	16.0	18.5	7.0	5.5
马铃薯	68.5	26.7	2.6	0.1	0.9	1.2
木薯	70.3	21.4	1.2	0.4	1.1	0.5

表 3-4 几种常用有机氮源的含氮量

氮源	豆粕	花生粉	酵母水解物	血粉	大豆粉	菜子饼	棉子饼	玉米浆
含氮量 (%)	8.1	8.0	8.0	12.3	8.0	6.0	6.3	4.5

(三) 无机盐

无机盐为微生物生长提供必需的矿质元素。这些元素参与酶的组成，构成酶活性基团，激活酶活性，维持细胞结构的稳定性，调节细胞渗透压，控制细胞的氧化还原电位，有时还可以作为

某些微生物生长的能源物质。由此可见，无机盐在调节微生物生命活动中起着重要作用。

根据微生物对无机盐的需求量通常将无机盐分为主要元素和微量元素两类。微量元素需求量极少，因此混杂在水或其他营养物中的极微数量就足以满足微生物的需要。某些微量元素对代谢产物特别是酶活性起着非常重要的作用。但无特殊原因，一般配制培养基时没有另外加入微量元素的必要。几种常用无机盐的浓度范围见表 3-5，某些无机元素的来源及其生理功能如表 3-6 所示。

表 3-5 几种常用无机盐的浓度范围

成分	KH_2PO_4 或 K_2HPO_4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	KCl	CaCO_3	$\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$\text{ZnSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
浓度 (%)	1.0~4.0	0.25~3.0	0.5~12.0	5.0~17.0	0.01~0.1	0.1~1.0	0.01~0.1	0.003~0.01

(四) 水

天然水含有不同类型和不同量的矿物质，具有一定的硬度和碱度，水的质量对微生物的生长和发酵产物的形成有一定影响。如一些著名的酿酒厂附近都有优质的水源。达不到要求的水可以经过处理达到发酵的要求，处理方法有絮凝法、离子交换法、电渗析法、反渗透法等。

(五) 生长因子

生长因子是一类对微生物正常代谢必不可少且不能用简单的碳源或氮源自行合成的有机物。广义的生长因子除了维生素外，还包括碱基、卟啉及其衍生物、甾醇、胺类、脂肪酸等。生长因子虽然需要量不大，但却是某些微生物生长代谢所必需的。另外，某些微生物不仅可以自行合成维生素，而且可以在细胞中大量积累某种维生素，因此可以通过微生物发酵来生产某些维生素。

表 3-6 某些无机元素的来源及其生理功能

元素	来源	生理功能
P	PO_4^{3-}	①核酸、核苷酸、磷脂组分 ②参与能量转移 ③缓冲 pH 值
S	SO_4^{2-} 、 H_2S 、S、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、 有机硫化物	①参与含硫氨基酸、CoA、生物素、硫辛酸的组成 ②硫化细菌的能源 ③硫酸盐还原细菌代谢中的电子受体
Mg	Mg^{2+}	①许多酶的激活剂 ②组成光合菌中的细菌叶绿素
K	K^+	①酶的激活剂 ②物质运输
Ca	Ca^{2+}	①辅助因子、激活剂 ②细菌芽孢的组分
Fe	Fe^{3+} Fe^{2+}	①细胞色素组分 ②酶辅助因子、激活剂 ③ Fe^{2+} 是铁细菌的能源
Mn	Mn^{2+}	酶的辅助因子、激活剂
Zn	Zn^{2+}	参与醇脱氢酶、醛缩酶、RNA 聚合酶及 DNA 聚合酶的活动
Na	Na^+	嗜盐菌所需
Cu	Cu^{2+}	细胞色素氧化酶所需

(六) 前体

前体是指在产物合成过程中，被菌体直接用于产物合成而自身结构无显著改变的物质。加入前体能明显提高产品的产量，在一定条件下还能控制菌体合成代谢产物的流向。前体最早是在青霉素生产中发现的。当在青霉素发酵培养基中加入玉米浆后，青霉素产量可从 $20\text{IU}/\text{mL}$ 增加到 $100\text{IU}/\text{mL}$ 。进一步研究发现这是由于玉米浆中含有苯乙胺，它能优先结合到青霉素分子中，从而提高了青霉素 G 的产量。虾青素发酵时添加前体物质甲羟戊酸，细胞内虾青素和总色素增加了 4 倍。但应该指出的是，前体物浓度过高会造成对细胞的毒性，因此前体的添加应采用少量多次的流加工艺，以减少毒性和提高前体的利用率。

四、最佳培养基的确定

最佳培养基配比的确定应建立在对细胞的生长和代谢情况完全了解的前提下，从生物化学和生化工程技术原理出发来推断和计算出来。但目前还无法实现这一点。因此，确定最佳培养基主要还是通过单因子试验法、正交试验设计和均匀设计等试验方法来确定培养基的组成和配比。单因子试验方法是一种传统有效的方法，但其效率太低。由于发酵培养基成分复杂，且多种因素互相影响，因此常采用正交试验方法以减少试验次数，提高试验效率。正交试验法可节约大量人力物力，能基本反映出合适的发酵培养基配比。均匀设计是我国数学工作者方开泰教授根据数论方法提出的一种试验设计方法，它的基本出发点是让试点在整个试验范围内更加充分地均匀分散，从而具有更好的代表性，但每个因素的每个水平只做一次试验，而且可用计算机计算给出回归方程，便于分析发酵条件对发酵产物的影响，并可以大大减少试验次数，提高工作效率，降低试验成本。

五、培养基的灭菌

(一) 消毒和灭菌

工业发酵过程是利用某种特定的微生物在一定的环境中进行新陈代谢活动，从而获得某种产品的工业过程。若要进行工业发酵，首先必须有一个没有杂菌的可供微生物生长的良好环境，并保证在发酵过程中不受杂菌污染。为了做到这一点，就必须搞好灭菌和消毒工作。

消毒 (disinfection)，意即“去除感染”，也就是指杀灭引起感染的微生物。在治疗学与卫生学中消毒指的是杀灭病原微生物；在工业微生物中消毒指的是除去杂菌，除去会引起污染的微生物。

对微生物而言，失去繁殖能力就是死亡。因此，灭菌 (sterilization) 指的是杀死一切微生物 (包括繁殖体和芽孢等)，不分病原和非病原微生物，杂菌和非杂菌。

此外，消毒一般多指化学因素处理，灭菌一般多指物理因素处理。消毒的结果并不一定是无菌状态，灭菌的结果则是无菌状态。灭菌和消毒是发酵生产成败的关键。发酵罐、培养基、有关管道和空气等必须进行严格灭菌，无菌室、发酵车间环境等则要经常地进行不同程度的消毒。

(二) 灭菌方法

灭菌方法主要有：干热灭菌法、湿热灭菌法、过滤除菌法、射线灭菌法、化学药品灭菌法等。可以根据灭菌的对象和要求选用不同方法。

1. 干热灭菌法 最简单的干热灭菌是将金属或其他耐热材料制成的器物在火焰上灼烧，又称为灼烧灭菌法。在接种操作时用这种方法。大多数的干热灭菌是利用电热或红外线在某设备内加热到一定温度将微生物杀死。干热对微生物有氧化、蛋白质变性和电介质浓缩引起中毒等作用。氧化作用导致微生物死亡是干热灭菌的主要根据。由于微生物对于热的耐受力比湿热强得多，所以干热灭菌所需要的温度要高、时间要长。干热灭菌用于要求灭菌后保持干燥的物料、器具等。

2. 湿热灭菌法 湿热灭菌法是借助蒸汽释放的热能使微生物细胞中的蛋白质、酶和核酸分子内部的化学键，特别是氢键受到破坏，引起不可逆的变性，从而使微生物死亡。在有水分存在的情况下，蛋白质更易受热凝固变性，这是湿热灭菌的原理。湿热灭菌法又可分为巴斯德消毒法、高压蒸汽灭菌法和间歇灭菌法。

(1) 巴斯德消毒法。将待消毒的液体食品在 $63\sim 65^{\circ}\text{C}$ 下保持 30min，然后迅速冷却，以杀死其中可能存在的病原菌，保持食品的营养和风味。啤酒、黄酒、酱油、醋、牛奶等均用此法消毒。有些牛奶厂用高温瞬时消毒法 (100°C 加热 1min)。

(2) 高压蒸汽灭菌法。本法是湿热灭菌中效果最好的一种方法。工业发酵菌种培养及生产过程培养基、管道和设备的灭菌主要利用此方法。一般在 0.1MPa 蒸汽压 (这时对应温度为 121.0°C) 下处理 $15\sim 30\text{min}$ ，即可达到灭菌目的。对体积大、热传导性差的物品，处理时间可相对长些。

高压蒸汽灭菌不是靠压力，而是靠蒸汽的高温。在灭菌时要排尽设备中空气，使容器内只有饱和蒸汽。否则，灭菌温度将低于容器上压力表所示压力所对应的温度。

注意，在 100°C 以上高温会变质的物品不适宜用此法灭菌。

(3) 间歇灭菌法。将待灭菌物品置于蒸锅 (蒸笼) 内常压蒸 $15\sim 30\text{min}$ ，以杀死其中微生物营养细胞。冷后置于一定温度 ($28\sim 37^{\circ}\text{C}$) 下培养过夜，促使第一次蒸煮中未被杀死的芽孢或孢子萌发成营养细胞，再用同样的方法处理。如此反复三次，可杀灭所有营养细胞、芽孢和孢子，达到灭菌的目的。此法既麻烦又费时，一般只用于有些不宜用高压蒸汽灭菌的物品和培养基，如某些糖、明胶或牛奶培养基等。此外，在没有高压蒸汽灭菌器时，也可以采用本灭菌法。

3. 过滤除菌法 对于蛋白质、酶、血清、维生素等热敏性物质，常采用微孔过滤除菌法。常用的微孔过滤有陶瓷膜、金属膜、聚砜膜、尼龙膜，还有熔结玻璃细菌滤器、火棉胶、硝化纤维素滤膜等。一般孔径为 $0.2\sim 0.4\mu\text{m}$ ，最大孔径不超过 $1\mu\text{m}$ 的过滤介质可以得到无菌滤液。

发酵工业所用的无菌空气也是通过种种过滤除菌而获得的。微生物实验室中使用的超净工作台也是采用过滤除菌的。微孔过滤法已成为完全除菌的主要方法，已被广泛采用。过滤除菌法的缺点是无法去除噬菌体或病毒。

4. 放射性灭菌法 通常用紫外线、高速电子流的阴极射线、X 射线和 γ 射线等进行灭菌，以紫外线最常用。紫外线对芽孢和营养细胞都能起作用，但是细菌芽孢和霉菌孢子对紫外线的抵抗力强。而且紫外线的穿透力低，只能用于表面灭菌，对固体物料灭菌不彻底，也不能用于液体

物料灭菌，一般用于无菌室、培养室等空间灭菌。波长在 250~270nm 之间杀菌效率高，尤以波长 260nm 左右杀菌效率为最高。一般用 30W 紫外线灯照射 30min。温度高，杀菌效率高；湿度大，灯的使用寿命短；空气中悬浮杂质多，杀菌效率低。

5. 化学药品灭菌法 在发酵工业中有的场合不能采用以上方法灭菌，如生产车间环境灭菌、人们接种操作前双手的灭菌等，因此都必须采用化学药品灭菌。化学药品灭菌的使用方法，根据灭菌对象不同有浸泡、添加、擦拭、喷洒、气态熏蒸等。以下介绍发酵工业中常用的化学药品灭菌剂。

(1) 高锰酸钾溶液。高锰酸钾溶液的灭菌作用是使蛋白质、氨基酸氧化，使微生物死亡，常用浓度为 0.1%~0.25%。

(2) 漂白粉。漂白粉的化学名是次氯酸盐（次氯酸钠 NaClO ），它是强氧化剂，也是廉价易得的灭菌剂。漂白粉溶液在碱性、无其他金属离子、避光下稳定，加入次氯酸钙可增加其稳定性。它的杀菌作用是次氯酸钠分解为次氯酸，后者不稳定，在水溶液中分解为生态氧和氯，使细菌受强烈氧化作用而导致死亡，对杀死细菌和噬菌体均有效。杀菌用的漂白粉有：低标准漂白粉（含 30% 有效氯）、高标准漂白粉（含 70% 有效氯）和商品次氯酸钠溶液（含 15% 有效氯）。使用时配制成 5% 溶液，用于喷洒生产场地，其杀菌效果取决于喷洒的细度，极细的雾沫比粗大的雾沫效果大 10 倍。漂白粉是发酵工业的生产场地最常用的化学杀菌剂。但是使用时应注意，并非所有噬菌体对漂白粉都敏感，因此应该轮流用药。

(3) 75% 酒精溶液。75% 酒精溶液的杀菌作用在于使细胞脱水，引起蛋白质凝固变性。无水酒精杀菌能力很低，因为高浓度酒精使细胞表面形成一层膜，使酒精不能进入细胞内部，达不到杀菌作用。75% 酒精溶液对营养细胞、病毒、霉菌孢子均有杀灭作用，但对细菌芽孢的杀灭能力较差。75% 酒精溶液常用于皮肤和器具表面杀菌。

(4) 新洁尔灭和杜灭芬。新洁尔灭（十二烷基二甲苯甲基溴化铵）和杜灭芬（十二烷基二甲苯乙氧乙基溴化铵）是表面活性剂类洁净消毒剂。它在水溶液中以阳离子形式与菌体表面结合，引起菌体外膜损伤和蛋白质变性。对营养细胞 10min 能杀灭，但对细菌芽孢几乎没有杀灭作用。一般用于器具和生产环境消毒，不能与合成洗涤剂合用，不能接触铝制品。使用浓度为 0.25%。

(5) 甲醛。甲醛（ HCHO ）是强还原剂，它能与蛋白质的氨基结合，使蛋白质变性，对氨基酸和蛋白质的变性有较强活性，这是用甲醛作为灭菌剂的根据。高浓度纯甲醛为 37% 水溶液，以水合物状态存在。甲醛溶液中加入 8%~15% 甲醇，可增加稳定性，防止甲醛发生聚合。甲醛具有很强的刺激臭味，能刺激眼、鼻和咽喉黏膜，在使用时应注意对人体的危害。

气态甲醛与甲醛水溶液所产生的甲醛蒸气的灭菌效果基本相同。在 0~37℃，甲醛的灭菌效果差别不大，当温度上升或相对湿度在 50% 以上，可增加灭菌效果。将多聚甲醛气化，或以 2 份 37% 甲醛溶液与 1 份 KMnO_4 混合，或将 37% 甲醛溶液直接加热，都可以产生气态甲醛用于灭菌。也可将 37% 甲醛溶液喷雾，用于杀灭空气中的微生物。在容器中， 1m^3 用 37% 甲醛溶液 18mL，1~2h 内可杀灭营养细胞，但对细菌芽孢的杀灭需要 12h，甚至更长时间。甲醛灭菌的缺点是穿透力差。

(6) 戊二醛。戊二醛 [$\text{CHO}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$] 是近年来广泛使用的一种广谱、高效、速效杀菌

剂,使用范围正在逐渐扩大。在酸性条件下不具有杀死芽孢的能力,只有在碱性条件(加入碳酸氢钠或碳酸钠)才具有杀死芽孢的能力,常用的浓度为2%。常用于器皿、仪器和工具等灭菌。

(7) 过氧乙酸。过氧乙酸(CH_3COOOH)是一种强氧化剂,沸点 110°C ,温度高于沸点时具有爆炸性,温度较低时分解生成乙酸和 $1/2$ 分子氧。它是广谱、高效、速效的化学杀菌剂。

(三) 培养基灭菌机理

在发酵工业生产中,深层发酵所用的培养基是用实罐灭菌法或连续灭菌法进行灭菌的。这两种灭菌法是生产规模的高压蒸汽灭菌法。在高温下,微生物的死亡要比有机营养物质的破坏快。因此,在高压蒸汽灭菌时,只要在最高温度维持的时间足够短,则随着温度升高,营养物质的损失逐渐减少。

实罐灭菌在发酵罐(种子罐)中就地进行。连续灭菌指的是让培养基连续通过高温蒸汽灭菌塔,维持一短时间后立即进入发酵罐的灭菌方法。连续灭菌法可以减少培养基有效成分的破坏。

1. 微生物的热死规律——对数残留定律 微生物的热死是指微生物受热失活,但是物理性质不变。微生物虽然是一个复杂的高分子体系,但受热死亡是由于蛋白质变性所致。在一定温度下,微生物热死遵循分子反应速度理论。在微生物受热失活过程中,微生物不断地被杀死,活菌数不断减少,其减少速度随活菌数残留量的减少而降低(表3-7)。

表 3-7 100°C 时不同时间微生物存活数

时间 (min)	存活数 (个/mL)	时间 (min)	存活数 (个/mL)
0	9×10^7	15	1×10^6
6	1.2×10^7	20	2×10^5
7	8×10^6	25	2×10^4
9	5×10^6	30	≈ 0
11	3×10^6		

菌体的死亡速率 $-\frac{dN}{d\theta}$ 与任何瞬间残留的活菌数 N 成正比。

$$\text{即} \quad -\frac{dN}{d\theta} = kN \quad (3-1)$$

式中： N ——残留活菌数 (个)；

θ ——受热时间 (min)；

k ——速度常数 (min^{-1})。

将式 (3-1) 积分, 得： $\int_{N_0}^{N_\theta} -\frac{dN}{N} = k \int_0^\theta d\theta$

$$N_\theta = N_0 e^{-k\theta}$$

两边取对数, 得

$$\theta = \frac{1}{k} \ln \frac{N_0}{N_\theta} \quad \text{或} \quad \theta = 2.303 / k \lg \frac{N_0}{N_\theta} \quad (3-2)$$

式中： N_0 ——开始灭菌时原有活菌数 (个)；

N_θ ——经过 θ 时间灭菌后的残留菌数 (个)。

从式 (3-2) 可见, 灭菌时间取决于污染程度 (N_0)、灭菌程度和 k 值。在培养基中有各种各样的微生物, 不可能逐一加以考虑, 如果将全部微生物均作为耐热的细菌芽孢来计算灭菌时间和温度, 就得加长加热时间和提高温度。因此, 一般只考虑芽孢细菌和细菌的芽孢数之和作为计算依据较为合理。另一个问题是灭菌程度, 即残留菌数, 如果要求完全彻底灭菌, 即 $N_\theta = 0$, 事实上也不可能。一般采用 $N_\theta = 0.001$, 即 1 000 次灭菌中有 1 次失败。

2. 反应速度常数 k 反应速度常数 k 是微生物耐热性的一种特征, 它随微生物种类和灭菌温度而异。相同温度下, k 值愈小, 则此微生物愈耐热。121°C 下, 细菌芽孢的 k 值约为 1min^{-1} , 而营养细胞的 k 值为 $10 \sim 10^{10}\text{min}^{-1}$, 可见细菌芽孢的 k 值比营养细胞小得多, 即细菌芽孢耐热性比营养细胞大, 某些细菌芽孢在 121°C 时的 k 值见表 3-8。同一种微生物在不同灭菌温度下, k 值不同, 灭菌温度愈低, k 值愈小; 温度愈高, k 值愈大。

表 3-8 121°C 下某些细菌芽孢的 k 值

细菌芽孢名称	k 值 min^{-1}
枯草芽孢杆菌 FS ₅₂₃₀	3.8~2.6
脂肪嗜热芽孢杆菌 FS ₁₅₁₈	0.77
脂肪嗜热芽孢杆菌 FS ₆₁₇	2.9
产气荚膜梭菌 PA ₃₆₇₉	1.8

3. 杀灭细菌芽孢的温度和时间 表 3-9 为 Mc Culloch Guina 归纳许多作者用湿热灭菌法杀灭细菌芽孢时所需的温度和时间。从表中可看出, 杀灭细菌芽孢的温度和时间一般根据试验决定, 也可以推算得到。例如 Rahn 计算 100~135°C 范围内大多数细菌芽孢的温度系数为 8~10, 以此为基准推算不同温度下的灭菌时间, 结果列于表 3-10。

表 3-9 湿热灭菌杀灭细菌芽孢的温度和时间

作者	温度 (°C)	时间 (min)
Sykes	130	2.4
Sykes	125	6.4
Sykes	121	15
Jorden	120	5
Mur	120	7.5
Gerard	115.5	10
Sykes	115	51

表 3-10 大多数细菌芽孢的杀灭温度和时间

温度 (°C)	100	110	115	121	125	130
时间 (min)	1200	150	51	15	6.4	2.4

4. 培养基灭菌温度的选择 培养基灭菌过程中, 除微生物被杀死外, 还伴随着培养基成分被破坏, 在加热下氨基酸及维生素等受破坏。在生产中必须选择既能达到灭菌目的, 又能使培养基成分破坏减少至最少的条件。

灭菌过程微生物死亡是属于一级反应动力学类型。在其他条件不变时, 反应速度常数与温度

的关系可用阿累尼乌斯方程式表示：

$$k = Ae^{-E/RT} \quad (3-3)$$

式中：A——比例常数；

E——杀死细菌所需的活化能（ $\times 4.18\text{J}/\text{mol}$ ）；

R——气体常数；

T——热力学温度（K）。

式（3-3）也可写成：

$$\lg k = \frac{-E}{2.303RT} + \lg A \quad (3-4)$$

以 $\lg k$ 对 $\frac{1}{T}$ 标绘得一直线，其斜率为 $\frac{-E}{2.303R}$ ，截距为 A，从截距和斜率可求得 A 和 E 值。培养基成分受热破坏是化学分解反应，为一级动力学反应，可用下式表示：

$$-\frac{dc}{d\theta} = k'_c$$

式中：c——反应物浓度（mol/L）；

θ ——反应时间（min）；

k'_c ——化学反应速度常数（ min^{-1} ），因温度和反应物种类而不同。

在化学反应中，其他条件不变时，反应速度常数与温度的关系也可用阿累尼乌斯方程式表示：

$$k' = A'e^{-E'/RT}$$

在灭菌时，当温度变化，菌死亡速度常数 k 和培养基成分破坏速度常数 k' 都变化。温度由 T_1 升高到 T_2 ， k 值分别为：

$$k_1 = Ae^{-E/RT_1} \quad k_2 = Ae^{-E/RT_2}$$

将两式相除并取对数，得：

$$\ln \frac{k_2}{k_1} = \frac{E}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (3-5)$$

同样，灭菌时，培养基成分的破坏也可得类似关系：

$$\ln \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{E'}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (3-6)$$

将式（3-5）和式（3-6）相除，得：

$$\frac{\ln \frac{k_2}{k_1}}{\ln \frac{k'_2}{k'_1}} = \frac{E}{E'}$$

杀灭细菌芽的活化能 E 大于 B 族维生素破坏的活化能 E'（表 3-11）。因此，

$\ln \frac{k_2}{k_1}$ 大于 $\ln \frac{k'_2}{k'_1}$ ，即随着温度上升，灭菌速率常数增加倍数大于培养基成分分解的速度常数的增加倍数。也就是说，温度升高，菌死亡速率大于培养基成分破坏的速率。

表 3-11 B 族维生素和细菌芽孢的活化能

维生素名称	活化能 (×4.18J /mol)	细菌芽孢名称	活化能 (×4.18J /mol)
维生素 B ₆	16 800	嗜热芽孢杆菌 1518	67 000
泛醇	21 000	腐化厌氧菌	72 000
维生素 B ₁₂	23 000	肉毒梭菌	82 100
维生素 B ₁	26 000		

达到相同的灭菌效果，提高灭菌温度可以明显缩短灭菌时间，并可减少培养基因受热时间长使营养成分遭到破坏的损失。不同温度的灭菌时间及培养基营养成分的破坏情况，见表 3-12。

表 3-12 不同温度灭菌时间及培养基破坏情况

温度 (°C)	灭菌时间 (min)	营养成分破坏 (%)	温度 (°C)	灭菌时间 (min)	营养成分破坏 (%)
100	400	99.3	130	0.5	8
110	30	67	140	0.08	2
115	15	50	150	0.01	<1
120	4	27			

生产实践亦证明，达到同样的灭菌效果，灭菌温度较高而时间较短比温度较低而时间较长要好。

第三节 菌种活化与扩大培养

生产菌种在使用之前，多采用斜面冰箱保藏法、砂土管保藏法、石蜡油封存法或真空冷冻干燥保藏法等方法保藏，所以菌种必须经过菌种活化与扩大培养。所谓菌种活化与扩大培养是指将保存的处于休眠状态的生产菌种接入试管斜面培养活化后，再经过茄子瓶或摇瓶及种子罐逐级扩大培养而获得一定数量和质量的纯种过程。这些纯种培养物又称为种子。

要获得优质种子必须具备以下五种条件：①有一种能使保存的菌种转移到存活力能达到最大的复活培养基上的方法；②有一个不引起种子染菌的接种场所；③具有定量判断种子质量标准的方法；④具有定量测定菌种一系列生理状态变化的方法，以能正确地反映生物物质的连续变化；⑤选择能满足种子扩大培养的容器和其他环境条件。

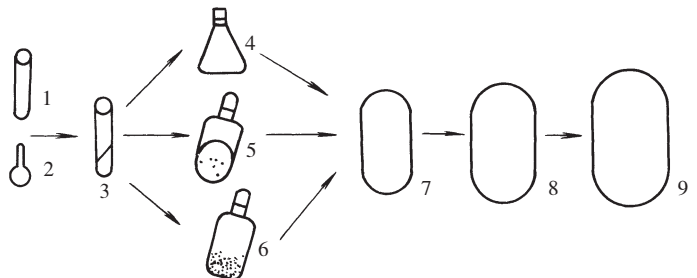


图 3-2 种子扩培工艺流程

1. 砂土孢子
2. 冷冻干燥孢子
3. 斜面孢子
4. 摇瓶液体培养
5. 茄子瓶斜面培养
6. 固体培养基培养
7. 8. 种子罐培养
9. 发酵罐

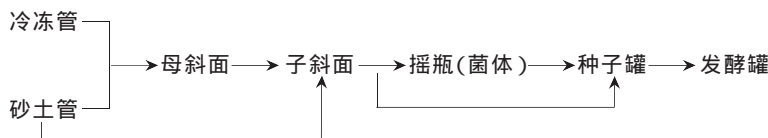
种子扩大培养的一般工艺流程如图 3-1 所示。其过程大致可分为实验室制备阶段和生产车间种子制备阶段。实验室制备阶段包括琼脂斜面、固体培养基扩大培养或摇瓶液体培养；生产车间种子制备阶段的任务是种子罐扩大培养。

一、实验室种子制备

实验室种子制备包括斜面、茄子瓶、固体培养基、菌体制备和摇瓶液体种子制备。

(一) 菌体制备

1. 细菌和放线菌类 细菌培养多采用肉汤琼脂培养基，而放线菌类的孢子培养多数采用人工合成琼脂培养基，其中碳源氮源不要太丰富，碳氮之比以氮少一些为好，避免菌体的大量形成，以利于产生大量孢子。其工艺过程见下图。



细菌培养温度大多为 37°C ，1~3d；放线菌类孢子的培养温度大多数为 28°C ，部分菌种为 30°C 或 37°C ，培养时间因菌种不同而异，一般为4~7d，也有长到14d的。孢子成熟后，于 5°C 冰箱（库）内保存备用，存放时间不宜过长，一般在一周内，少数菌种可存放1~3个月。

2. 霉菌类 霉菌类孢子的培养多数采用大米、小米、麦麸等天然固体培养基。这些营养物质来源丰富、简单易得、价格低廉，比琼脂培养基产孢子量大得多。其工艺过程为：首先将保存于砂土管或冷冻管中的菌体孢子接种在斜面上恒温培养，待孢子成熟后制成孢子悬浮液，然后接种到含大米、麸皮等成分的培养基上，在 $25\sim 28^{\circ}\text{C}$ 下通常培养4~14d，具体时间因菌种而异。制好的孢子可放在 5°C 冰箱中保存备用，也可通过真空干燥进行保存备用。经过真空干燥的孢子菌种可在生产上连续使用半年左右，这对稳定生产有好处。真空干燥法保存主要适用于孢子制备，纯粹的菌体不宜采取此法保存，因为容易引起死亡。

(二) 摇瓶种子制备

以孢子形成的种子可以直接进罐，其优点是工艺路线较短，容易控制，斜面孢子易于保藏；若菌种纯度高，一次可以制备大量孢子，因此可节约人力、物力和时间，并可减少染菌机会，为稳定生产提供有利条件。但某些菌种的孢子发芽和菌体繁殖速度较缓慢，为了缩短种子罐培养周期和稳定种子质量，将孢子经摇瓶培养成菌体后再进罐，这就是所谓的摇瓶种子。摇瓶相当于大大缩小了的种子罐，其培养基配方和培养条件与种子罐相似。制备摇瓶种子的目的是使孢子发芽长成健壮的菌体，同时对斜面孢子的质量和无菌情况进行考察，然后择优选用。

摇瓶种子的培养基成分要求比较丰富和完全，并易于分解利用，氮源丰富利于菌体生长。摇瓶种子进罐的缺点是工艺过程长，操作过程中染菌几率较高。摇瓶种子的质量，主要根据外观颜色、菌体浓度或黏度、糖氮代谢、pH、杂菌情况等指标检验，符合要求后方可进罐。

二、生产车间种子制备

实验室制备的孢子或摇瓶菌体种子移到种子罐扩大培养，种子罐培养基虽因不同菌种而异，但配制原则是相同的。种子罐培养时需要供给足够的无菌空气，并不断搅拌，使菌体在培养液中均匀分布，获得相同的培养条件。种子原液一般采用微孔接种法接种，摇瓶菌体种子可在火焰保护下接入种子罐或采用压差法接入。种子罐之间或发酵罐间的移种方式，主要采用压差法，由种子接种管道进行移种，移种过程中要防止接受罐表压降至零，否则会引起染菌。

(一) 种子罐级数的确定

种子罐的作用在于使实验室中有限数量的菌体发芽、生长并繁殖成大量菌体，接入发酵罐培养基后能迅速生长，达到一定菌体量，以利于产物的合成。种子罐级数是指制备种子需逐级扩大培养的次数，这一般根据菌种生长特性、孢子发芽及菌体繁殖速度，以及所采用发酵罐的容积而定。对于生长快的细菌，种子用量比例少，故种子罐相应少。如谷氨酸生产中，采用茄子瓶斜面或摇瓶种子接入种子罐于 32℃ 培养 7~10h，菌浓度达 $10^8 \sim 10^9$ 个/mL，即可作为种子接入发酵罐，这称为一级种子罐扩大培养，也称二级发酵。生长较慢的菌种，如青霉素生产菌种，其孢子悬浮液接入一级种子罐于 27℃ 培养 40h，此时孢子发芽，长出短菌体，故也称发芽罐。再移至含有新鲜培养基的第二级种子罐，于 27℃ 培养 10~24h，菌体迅速繁殖，获粗壮菌体，故又称繁殖罐。此菌体即可作为种子移至发酵罐，这称为二级种子罐扩大培养，也称三级发酵。一般 50m^3 以上的大型发酵罐都可采用三级发酵。糖化酶的发酵也都采用二级种子，三级发酵。在小型发酵罐 (5~30L) 中进行试验时，也有采用直接孢子或菌体接入罐中发酵的，这称一级发酵。

种子罐的级数越少，越有利于简化工艺和控制，并可减少由于多次移种而带来染菌的机会。但也必须考虑尽量延长发酵罐生产产物的时间，缩短由于种子发芽和生长所占用的非生产时间，以提高发酵罐的生产率。

(二) 种龄与接种量

1. 接种 种龄是指种子罐中培养的菌体开始移入下一级种子罐或发酵罐时的培养时间。在种子罐中，随着培养时间的延长，菌体量增加，基质消耗及代谢产物积累，菌体量不再增加，而逐渐趋于老化。因此选择适当的种龄显得十分重要。通常，种龄以菌体处于生命力极为旺盛的对数生长期，且培养液中菌体量还未达到最高峰时较为合适。

过于年轻的种子接入发酵罐后，往往会出现前期生长缓慢，整个发酵周期延长，产物开始形成的时间推迟，甚至会因菌体量过少而在发酵罐内结球，造成异常发酵的情况。过老种子会引起生产能力下降而菌体过早自溶。

2. 接种量 接种量是指移入的种子液体积和接种后培养液体积的比例。在丝状菌发酵生产中，最适接种量多为 7%~15%，有时可增加到 20%~25%。而细菌发酵中接种量相对较小，一般为 1%~2%，如用棒杆菌生产的谷氨酸发酵中的接种量只需 1%。

接种量的大小决定于生产菌种在发酵中生长繁殖的速度。采用较大的接种量可以缩短发酵罐中菌体繁殖到达高峰的时间，使产物的形成提前到来。这是由于种子量多，同时种子液中含有大

量体外水解酶类，有利于对基质的利用，并且生产菌迅速占据了整个培养环境，则可减少杂菌生长的机会。但是，如果接种量过多，往往使菌体生长过快，培养液黏度增加，造成溶解氧不足，从而影响产物的合成。如对嗜碱性芽孢杆菌生产碱性蛋白酶的研究中发现 1% 接种量产酶活力最高，在 0.5%~4% 接种量之间虽有差别，但影响不大，如超过 4% 则酶产量明显下降。又例如大肠杆菌生产青霉酰胺酶中，接种量过大会使产酶活力大大下降。而接种量过小，除了延长发酵周期外，往往还会引起其他不正常情况。在头孢菌素生产中，接种量过小，会产生大量菌体团，而使产量降低。但有的抗生素如制霉菌素，用 1% 接种量比用 10% 接种量的效果好，而 0.1% 接种量与 1% 的效果相似。近年来，生产上多以加大种子量及采用丰富培养基作为获得高产的措施。

三、菌种质量的要求

种子质量的最终指标是考察其在发酵罐中所表现出来的生产能力。优质种子必须具备下列五项条件：①菌种细胞的生长活力强，移种到发酵罐后能迅速生长以缩短延滞期；②生理性状稳定，以便得到稳定的菌体生长过程；③具有适宜的菌体总量及浓度，以满足大容量发酵的要求；④无杂菌污染，以确保整个发酵过程正常进行；⑤保持稳定的生产能力，使最终产物的生物合成量持续稳定高产。

因此，首先必须保证生产菌种的稳定性，其次是提供种子培养的适宜环境，保证无杂菌侵入，以获得优良种子。

（一）菌种稳定性的检查

生产上所使用的菌种必须保持稳定的生产能力，虽然菌种保藏在休眠状态环境中，但微生物或多或少会出现变异的危险，因此定期考察及挑选稳定菌种投入生产是十分重要的。其方法是取出少许保藏菌种置于灭菌生理盐水中逐级稀释，在含有琼脂培养基的双碟上划线培养，菌液稀释度以双碟上所生长的菌落不至于过密为宜。挑出形态整齐、孢子丰满的菌落进行摇瓶试验，测定其生产能力，以不低于其原有的生产活力为原则，并取生产能力高的菌种备用。

一般，不管用什么方法保藏菌种，一年左右都应做一次自然分离。

（二）无（杂）菌检查

在种子制备过程中每移种一次均需进行杂菌检查。通常采用的方法有：种子液显微镜观察、肉汤或琼脂斜面接入种子液培养进行无菌试验和对种子液进行生化分析。其中无菌试验是判断杂菌的主要依据。

无菌试验主要是将种子液涂在双碟上划线培养、斜面培养和酚红肉汤培养，经肉眼观察双碟上是否出现异常菌落、酚红肉汤有否变黄色及镜检鉴别是否污染杂菌。在移种的同时进行上述试验，经涂双碟及接入肉汤后于 37℃ 培养，在 24h 内每隔 2~3h 取出在灯光下检查一次。24~48h 间每天检查一次，以防生长缓慢的杂菌漏检。

种子液生化分析项目主要为取样测定其营养消耗的速度、pH 变化、溶氧利用情况、色泽和气味有否异常等。

第四节 空气除菌

耗氧发酵和微生物在繁殖培养过程中需要氧气，通常以空气作为氧源。但空气中含有各种各样的微生物，如果这些微生物随着空气进入培养液，在适宜的条件下，它们会迅速大量繁殖，消耗大量的营养物质，以及产生各种代谢产物，干扰甚至破坏预定发酵的正常进行，使发酵产品的含量降低，产量下降，甚至造成发酵彻底失败而倒罐。因此空气的除菌就成为耗氧发酵工程上的一个重要环节。除菌的方法很多，如过滤除菌、静电除菌、辐射杀菌等，各种方法的除菌效果、设备条件、经济指标各不相同。实际生产中所需的除菌程度根据发酵要求而定，既要避免染菌，又要尽量简化除菌流程，以减少设备投资和正常运转的动力消耗。

一、通气发酵对无菌空气的要求

(一) 空气中微生物的分布

微生物在固体或液体中繁殖后，很多细小而轻的菌体、芽孢或孢子，会随水分的蒸发、物料的移动被气流带入空气中或黏附在灰尘上而漂浮于气流中，故空气中含菌量随环境的不同而有很大的差异。一般干燥寒冷的北方空气含菌量较少，而潮湿温暖的南方含菌较多，人口稠密的城市比人口少的农村含菌量多，地平面又比高空的空气含菌量多。因此，研究空气中的含菌情况，选择良好的取气位置和提高空气除菌系统的除菌效率，是发酵工业保证正常生产重要内容。

各地空气所悬浮的微生物的种类以及比例各不相同，数量也随条件的变化而异，一般设计时以含量为 $10^3 \sim 10^4$ 个 / m^3 进行计算。

(二) 发酵对空气无菌程度的要求

各种不同的发酵过程，由于所用菌种的生长能力强弱、生长速度的快慢、它的分泌物的性质、发酵周期的长短、培养物的营养成分和 pH 的差异，对所用的无菌空气的无菌程度有不同的要求。如酵母培养过程，因它的培养基是以糖源为主，有机氮比较少，它能利用无机氮源，要求的 pH 较低，在这样的条件下，一般细菌较难繁殖，而酵母的繁殖速度又较快，在繁殖过程中能抵抗少量的杂菌影响，因而对无菌空气的要求不如氨基酸、酶制剂、大型真菌、抗生素发酵那么严格。一般按染菌几率 10^{-3} 来计算，即 1 000 次发酵周期所用的无菌空气只允许 1~2 次染菌。

虽然一般悬浮在空气中的微生物，大多数是耐恶劣环境的孢子或芽孢，繁殖时需要较长的调整期，但是在阴雨天气或环境污染比较严重时，空气也会悬浮大量的活力较强的微生物，一个细菌进入培养物后，在培养物的良好条件下，只要很短的调整时间就能大量繁殖，如繁殖 15h 后，可达到 10^9 个。这样大量的杂菌就必然使发酵受到严重干扰或失败，估算是以进入 1~2 个杂菌即失败作为依据的。

(三) 空气含菌量的测定

要准确测定空气中的含菌量来决定过滤的空气含菌量是比较困难的，一般采用培养法或光学法测定其近似值。培养法在微生物学中已有介绍，这里只介绍光学法。

光学法采用粒子计数器，它是利用微粒对光线的散射作用来测量粒子的大小和含量。测量时

以一定速度将试样空气通过检测区，同时用聚光透镜将从光源来的光线聚成强烈光束射入测检区，在测检区内，空气试样受到光线强烈照射，空气中的微粒把光线散射出去，由聚光透镜投入光电倍增管，将光转换成电信号。粒子的大小与信号峰值有关。粒子的数量与信号脉冲频率有关。信号经自动计数器计算出粒子的大小和数量，显示读数。

这种仪器可以测量空气中含有直径 $0.3\sim 0.5\mu\text{m}$ 微粒的各种浓度，测量比较准确，但它只是微粒观念，不能测量空气中的活菌的数目。

二、除菌方法

空气除菌就是除去或杀死空气中的微生物。破坏生物体活性的方法很多，如辐射杀菌、加热杀菌、化学药物杀菌，都是将有机体蛋白质变性而破坏其活力。而静电吸附和介质过滤的方法是把微生物的粒子用分离方法除去。工业发酵所需的无菌空气要求高，用量大，故要选择运行可靠、操作方便、设备简单、节省材料和减少动力消耗的有效除菌方法。

(一) 辐射杀菌

从理论上来说，声能、高能阴极射线、X射线、 γ 射线、 β 射线和紫外线等都能破坏蛋白质活性而起杀菌作用。使用得较多的是紫外线杀菌，紫外线波长为 $254\sim 265\text{nm}$ 时杀菌效力最强，它的杀菌力与紫外线的强度成正比，与距离的平方成反比。紫外线通常用于无菌室、医院手术室等空气对流不大的环境下杀菌。但杀菌效率较低，杀菌时间较长，一般要结合甲醛蒸气消毒或苯酚的喷雾等来保证无菌室较高的无菌程度。

(二) 热杀菌

热杀菌是有效、可靠的杀菌方法，但是如果采用蒸汽或电热来加热大量的空气以达到杀菌目的，则需要消耗大量的能源和增设大量的换热设备，这是十分不经济的。利用空气压缩时放出的热量进行保温杀菌，这就比较经济。空气进口温度为 21°C ，空气的出口温度为 $187\sim 198^\circ\text{C}$ ，压力为 0.7MPa 。从压缩机出口到空气贮罐一段管道保温层进行保温，使空气达到高温后保持一段时间，保证微生物死亡。为了加长空气的高温时间，防止空气在贮罐中走短路，最好在贮罐内加装导筒。采用热杀菌装置时，还应装有空气冷却器，并排除冷凝水，以防止在管道设备死角积聚而造成杂菌繁殖的场所。在进入发酵罐前应加装分过滤器以保证安全，但采用这样系统压缩机能量消耗会相应增大，压缩机耐热性能要增加，它的零部件也要选用耐热材料加工。

(三) 静电除菌

静电除尘法已广泛使用，虽然它的除尘效果不很高，一般在 $85\%\sim 99\%$ 之间，但由于它消耗能量小，使用得当每处理 1000m^3 的空气只耗电 $0.2\sim 0.8\text{kW}\cdot\text{h}$ 。空气的压头损失小，设备也不大。常用于洁净工作台，洁净工作室所需无菌无尘空气的第一次除尘，配合高效过滤器使用。

静电除尘是利用静电引力吸附带电粒子而达到除菌除尘的目的。悬浮于空气中的微生物、微生物孢子大多带有不同的电荷，没有带电荷的微粒在进入高压静电场时都会被电离变成带电微粒，但对于一些直径很小的微粒，它所带的电荷很小，当产生的引力等于或小于气流对微粒的拖带力或微粒布朗扩散运动的动量时，则微粒就不能被吸附而沉降，所以静电除尘对很小的微粒效率较低。

用静电除菌进行空气净化，有如下优点：①阻力小， 10kPa ；②耗电小。但是，一次投资

大。

(四) 过滤除菌法

过滤除菌是目前发酵工业中经济实用的空气除菌方法，它采用定期灭菌的介质来阻截流过空气所含的微生物，从而取得无菌空气。常用的过滤介质有微孔滤膜、棉花、活性炭或玻璃纤维、有机合成纤维、有机烧结材料、无机烧结材料和金属烧结材料等等。由于被过滤的气溶胶中微生物粒子很小，一般只有 $0.5\sim 2\mu\text{m}$ ，而过滤介质的材料一般孔隙直径都大于微粒直径的几倍到几十倍，因此过滤机理比较复杂。同时，由于空气在压缩过程带入的油雾和水蒸气冷凝的水雾影响，使过滤的因素变化更多，当过滤介质孔隙小于或大大小于被过滤的微粒直径时，通常称为绝对过滤。

随着工业的发展，过滤介质逐渐由天然材料棉花过渡到微孔滤膜、玻璃纤维、超细玻璃纤维和其他烧结材料，如烧结金属、烧结陶瓷、烧结塑料等较新的过滤介质。因此，微孔过滤中绝对过滤的使用就越来越多了。

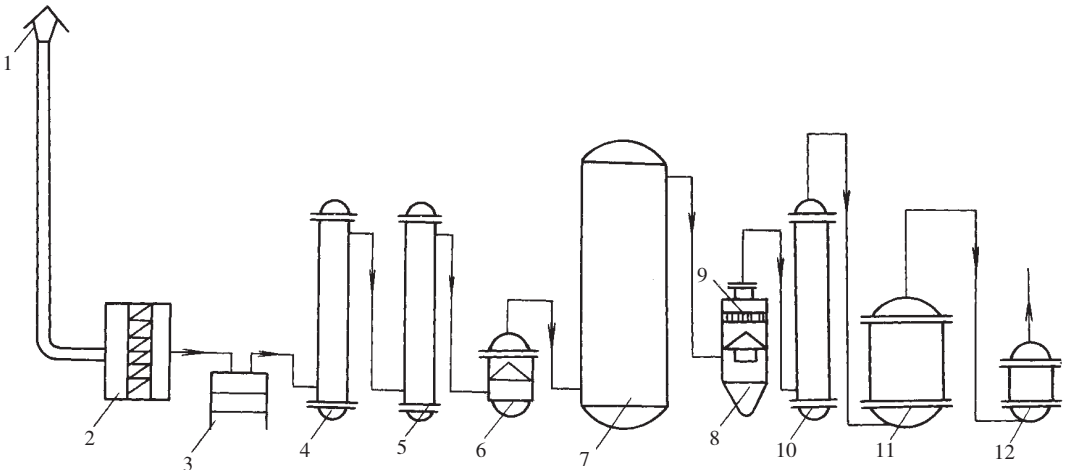


图 3-3 空气净化工艺流程图

1. 空气吸气口 2. 粗过滤器 3. 空气压缩机 4. 一级空气冷却器 5. 二级空气冷却器 6. 分水器
7. 空气贮罐 8. 旋风分离器 9. 丝网除沫器 10. 空气加热器 11. 总空气过滤器 12. 分过滤器

过滤除菌机理：空气溶胶的过滤除菌原理与通常的过滤原理不一样，一方面是由于空气溶胶中气体引力较小，且微粒很细小，悬浮于空气中的微生物粒子大小在 $0.5\sim 2\mu\text{m}$ 之间，深层过滤所用的过滤介质——棉花的纤维直径一般为 $16\sim 20\mu\text{m}$ 。充填系数为 8% 时，棉花纤维所形成网格的孔隙为 $20\sim 50\mu\text{m}$ 。超细纤维滤纸滤板，因纤维直径很细小，为 $1\sim 1.5\mu\text{m}$ ，其所制的滤板紧密度较大，所形成网格的孔隙为 $0.5\sim 5\mu\text{m}$ 。微粒随气流通过滤层时，滤层纤维所形成的网格阻碍气流直线前进，使气流出现无数次改变运动速度和运动方向，绕过纤维前进，这些改变引起微粒对滤层纤维产生惯性冲击、阻拦、重力沉降、布朗扩散、静电吸引等作用而把微粒滞留在纤维表面上，从而达到除菌的目的。

过滤效率就是滤层所滤去的微粒数与原来微粒的比值，它是衡量过滤设备的过滤能力的指标：

$$\eta = \frac{N_1 - N_2}{N_1} = 1 - \frac{N_2}{N_1} \quad (3-7)$$

式中： N_1 ——过滤前空气中微粒含量；

N_2 ——过滤后空气中微粒含量；

$\frac{N_2}{N_1}$ ——过滤前后空气中含有微粒数的比值，即穿透滤层的微粒数与原有微粒数的比值，称为穿透率。

实践证明，空气过滤器的过滤效率主要与微粒的大小、过滤介质的种类和它们的规格（纤维直径）、介质的填充密度、过滤介质层厚度以及阴性通过的空气气流速度等因素有关。

研究空气过滤器的过滤规律时，先排除一些复杂的因素，假定：①过滤器中过滤介质每一纤维的空气流态并不因其他邻近纤维的存在而受影响；②空气中的微粒与纤维表面接触后即被吸附，不再被气流卷起带走；③过滤器的过滤效率与空气中微粒的浓度无关；④空气中微粒在滤层中的递减均匀，即每一纤维薄层除去同样百分率的菌体。这样，空气通过单位滤层后，微粒浓度下降与进入空气微粒浓度成正比。

$$-\frac{dN}{dL} = kN_1 \quad (3-8)$$

式中： $\frac{dN}{dL}$ ——单位滤层所除去的微粒数（个/cm）；

N_1 ——进入滤层时空气中的微粒数（个）；

L ——滤层厚度（cm）；

k ——过滤常数（决定于过滤介质的性质和操作情况）。

将上式整理，积分

$$-\frac{dN}{N_1} = k dL$$

得

$$\ln \frac{N_2}{N_1} = -kL \frac{N_2}{N_1} = e^{-kL} \quad (3-9)$$

上式称为对数穿透定律，它表示进入滤层的微粒数与穿透滤层的微粒数之比的对数是滤层厚度的函数。其常数 k 的值与很多因素有关，如纤维的种类、纤维直径、填充密度、空气流速和空气中微粒的个数等，一般选择特定的条件，以实验方法求得。

第五节 发酵工艺控制

微生物培养是受菌种活性及环境条件制约的生化反应过程，在选育得到优良微生物菌种的前提下，发酵过程的控制对发酵产品高产、稳产起着至关重要的作用。同一菌种在不同厂家，由于设备、原材料来源、发酵过程控制等的差别，菌种的发酵水平也不尽相同。熟悉菌种性能，优化

发酵条件和发酵过程控制，则可以充分发挥菌种潜力，获得满意的发酵结果。

由于发酵过程的复杂性，使得生产过程的控制较为复杂。过程控制的参数较多，可以分为物理参数和化学参数两大类。表 3-13 和表 3-14 列出了一些可供发酵过程中监测的物理参数和化学参数。

表 3-13 发酵过程中可供监测的物理参数

参 数	单 位	测试方法	主要作用
温度	℃, K	传感器	维持生长、合成
罐压	Pa	压力表	维持正压, 增加溶解氧
空气流量	$\text{m}^3 / (\text{m}^3 \cdot \text{h}), \text{m}^3 / \text{h}$	传感器	供氧、排泄废气, 提高 k_{1a}
搅拌转速	r/min	传感器	物料混合, 提高 k_{1a}
搅拌功率	kW	传感器	反映搅拌情况, k_{1a}
黏度	Pa·s	黏度计	反映菌生长, k_{1a}
密度	g / cm^3	传感器	反映发酵液性质
装量	m^3, L	传感器	反映发酵液体积
浊度	透光度 (%)	传感器	反映菌体生长情况
泡沫		传感器	反映发酵代谢情况
传质系数 k_{1a}	L/h	间接计算, 在线监测	反映供氧效率
加糖速率	kg/h	传感器	反映耗氧速率
加入消泡剂速率	kg/h	传感器	反映泡沫情况
加入中间体及前体速率	kg/h	传感器	反映前体、基质利用情况
加入其他基质速率	kg/h	传感器	反映基质利用情况

表 3-14 发酵过程中可供监测的生化参数

参 数	单 位	测试方法	主要作用
菌体浓度	g (干细胞) /L	取样	了解生长情况
菌体中 RNA、DNA 含量	mg (干细胞) /g	取样	了解生长情况
菌体中 ATP、ADP、AMP 含量	mg (干细胞) /g	取样	了解菌体的能量代谢活力
菌体中 NADH_2 含量	mg (干细胞) /g	在线荧光法	了解菌体的合成能力
溶解氧浓度 (% 饱和度)	mg/L	传感器	反映氧供需情况
排出气体 O_2 浓度	mg/L	传感器	了解耗氧情况
菌体摄入氧速率	g/L·h	间接计算	了解耗氧情况
呼吸强度	$\text{gO}_2 / \text{g 菌} \cdot \text{h}$	间接计算	了解比耗氧情况
溶解 CO_2 浓度	% 饱和度	传感器	了解 CO_2 对发酵的影响
排出气体 CO_2 浓度	%	传感器	了解菌体呼吸情况
呼吸熵 (RQ)	无因次	间接计算	了解菌体代谢情况
酸碱度	pH	传感器	反映菌的代谢情况
氧化还原电位	mV	传感器	反映菌的代谢情况
效价或产物浓度	g/mL	取样 (传感器)	了解产物合成情况
前体或中间体浓度	mg/mL	取样	了解前体或中间体利用情况
氨基酸浓度	mg/100mL	取样	了解氨基酸等含量变化情况
无机盐浓度 (Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 等)	mol %	取样, 离子选择电极	了解离子含量对发酵的影响

尽管以上列出了许多影响发酵过程的参数，但一些参数在线检测和控制比较困难，生产中仅对其中的少数几个主要参数加以检测和控制。目前较常监控的参数主要包括温度、罐压、空气流

量、搅拌转速、pH、溶氧、产品浓度、糖含量、氮浓度、菌体浓度、基质浓度、排出二氧化碳气体浓度和泡沫等。

一、温度对发酵的影响及控制

(一) 发酵热

发酵过程中随着菌体的生长繁殖，代谢产物的形成，以及机械搅拌的作用，会产生一定的热量；同时由于发酵罐壁的散热、培养基水分的蒸发等也会带走部分热量。习惯上将发酵过程中释放的净热量称为发酵热。发酵热包括生物热、搅拌热、蒸发热和辐射热。

1. 生物热 在发酵过程中，由于菌体的生长繁殖和形成代谢产物，不断地利用营养物质，主要是碳源、氮源和脂肪，将其分解氧化获得能量，其中一部分能量用于高能化合物，供合成细胞物质和合成代谢产物所需要的能量。其余部分则以热的形式散发出来，这就是生物热。

生物热随菌种和培养条件不同而不同。菌种活力强，培养基丰富，菌体代谢旺盛，产生热量多。同一种微生物呼吸作用比发酵作用产生热量多。发酵过程的产热具有强烈的时间性，即在不同培养阶段，菌体呼吸作用和发酵作用强度不同，所产生的热量不同。在发酵初期，菌体处在适应期，菌数少，呼吸作用缓慢，产生热量少。当菌体处在对数生长期，菌体繁殖快，代谢旺盛，菌体浓度也大，产生热量多。特别是对数生长转入平衡期时，菌体浓度大，代谢旺盛，产生热量最多。发酵后期，微生物已基本停止繁殖，逐步衰老，产生的热量不多，且逐渐减弱，温度变化不大。

2. 搅拌热 机械搅拌通气发酵罐，由于机械搅拌带动发酵液进行运动，造成液体之间、液体与设备之间的摩擦作用，产生可观的热量，称为搅拌热。搅拌热与搅拌轴功率有关。可用下式计算：

$$Q_{\text{搅}} = P \times 3601 \quad (3-10)$$

式中： $Q_{\text{搅}}$ ——搅拌热 (kJ/h)；

P ——搅拌功率 (kW)；

3601——机械能转变为热能的热功当量 kJ/(kW·h)。

3. 蒸发热 通气时，引起发酵液水分蒸发，发酵液因蒸发而被带走的热量称为蒸发热。

$$Q_{\text{蒸发}} = G (I_{\text{出}} - I_{\text{进}}) \quad (3-11)$$

式中： G ——通入发酵罐中空气的重量流量 (kg/h)；

$I_{\text{出}}$ ——进口空气的热焓 (kJ/kg)；

$I_{\text{进}}$ ——出口空气的热焓 (kJ/kg)。

4. 辐射热 因发酵液温度与周围环境温度不同，发酵液部分热量通过罐体向外辐射。辐射热大小，取决于罐内外温度差，冬天大些，夏天小些，一般相差不超过5%。

因此，发酵过程中发酵热为：

$$Q_{\text{总}} = Q_{\text{生物}} + Q_{\text{搅拌}} + Q_{\text{蒸发}} + Q_{\text{辐射}}$$

(二) 发酵过程温度的影响和控制

微生物生长繁殖和产物的形成都是一系列生化反应的结果，同化学反应一样，反应速率和温度存在着相当的依存关系。温度升高，反应速率加大，生长代谢加快。但因菌体本身的蛋白质和

酶很易因热而变性和失去活性，温度越高，蛋白质和酶的变性和失活也越快，表现在菌体易于衰老，发酵周期缩短，影响产物的最终产量。温度影响细胞中酶的活性，从而影响代谢调节途径，造成产物变化。另外，温度还通过影响发酵液性质来间接影响发酵。例如温度影响基质中氧的溶解从而影响发酵。严格控制菌种生长繁殖和生物合成所需要的最适温度，对稳定发酵过程，缩短发酵周期，提高发酵单位和产量，具有十分重要的意义。

微生物生长温度可以分为最低、最适合和最高三种。低于最低生长温度，微生物就不能生长；达到最高生长温度，微生物生命活动就要停止或死亡。最适生长温度是指微生物生长最适宜的温度，在这个温度时，培养条件适当，则微生物生长最快。最适发酵温度则是指在该温度下最适于微生物的生长或发酵产物的生成。最适温度是一种相对的概念，它是在一定的条件下测得的结果。不同的微生物有不同的最适温度。同一种微生物菌体生长的最适温度和形成代谢产物的最适温度可能相同，也可能有所不同。对于同一微生物细胞，细胞生长和代谢产物积累的最适温度也往往是不同的。例如在谷氨酸发酵中，在发酵前期的长菌阶段和种子培养时应满足菌体生长最适温度。若温度过高，菌体容易衰老。生产上表现为 OD 值增长慢，pH 高，耗糖慢，发酵周期长，谷氨酸生成少，严重时抑制生长。遇到这种情况，应及时降温，采用小通气，以少量多次流加尿素；必要时可补加玉米浆，以促进生长。在发酵中期和后期，菌体生长已停止，为了大量累积谷氨酸，需要适当提高温度。由于温度对微生物的生长、繁殖和代谢产物的形成有重要的影响作用，因此为了使微生物的生长速度最快，目标产物产率最高，在发酵过程中必须根据微生物菌种的特性，选择和控制最适温度。

一般来说，接种温度可以适当提高些，以利于孢子的萌发或加快微生物的生长和繁殖。待发酵液的温度上升时，温度应控制在微生物的最适生长温度。当菌体生长到一定量时，温度的控制可比最适生长温度低些，即控制在微生物代谢产物合成的最适温度。

在各种微生物的培养过程中，各个发酵阶段的最合适温度的选择要从各个方面进行综合考虑，通过大量的生产实践才能准确掌握发酵的规律。近年来利用计算机模拟最佳的发酵条件，使发酵的温度能处于一个相对合适的条件成为现实。

二、溶解氧浓度对发酵的影响及监控

现代工业发酵使用的菌种多属好氧菌，此类微生物生长繁殖和代谢过程中氧作为呼吸过程的最终受氢体，只有在分子氧的存在下，才能正常生长和代谢。发酵过程中必须提供大量的氧，以满足菌体生长繁殖和代谢产物的大量产生对氧的需求，它是稳定和提高产量的关键之一。对多数发酵来说，通常需要供给大量的氧才能满足菌体对氧的需求，氧的不足会造成代谢异常，发酵单位和产量下降。液体发酵过程中微生物所利用的只能是溶解氧，但因氧气属于难溶性气体，故它常常是发酵生产的限制性因素。培养液内溶解氧的浓度往往受许多因素的影响，主要是受通气和搅拌功率所左右。

（一）溶解氧对发酵过程的影响

好氧微生物发酵时，主要是利用溶解于水中的氧，只有当这种氧达到细胞的呼吸部位才能发挥作用，所以增加培养基中的溶解氧后，可以增加推动力，使更多的氧进入细胞，以满足代谢的

需要。不影响微生物呼吸时的最低溶解氧浓度称为临界溶解氧浓度。在临界溶解氧浓度以下时，溶解氧是菌体生长的限制因素，菌体生长速率随着溶解氧的增加而显著增加，愈接近临界值，菌体生长速率愈快。达到临界值时，溶解氧已不是菌体生长的限制性因素。临界溶解氧浓度不仅取决于微生物本身的呼吸强度，还受到培养基的组分、菌龄、代谢物的积累、温度等其他条件的影响。生物合成最适溶解氧浓度和临界溶解氧浓度是不同的。前者是指溶解氧浓度对生物合成有一个最适的范围，过低的溶解氧，首先影响微生物的呼吸，进而造成代谢异常。但过高时对产量也未必有利，因为溶解氧不仅为生长提供氧，同时也为代谢供给氧，并造成一定的微生物的生理环境，它可以影响培养基的氧化还原电位。

每种微生物在确定的设备和发酵条件下，溶解氧浓度变化均有自己的规律。一般说来，发酵初期，菌体大量增殖，氧气消耗大，此时需氧量大于供氧量，溶解氧浓度明显下降，同时菌体摄氧量则出现高峰。发酵中后期，对于分批发酵来说，溶解氧浓度变化比较小。因为菌体已繁殖到一定程度，呼吸强度变化不大。到了发酵后期，由于菌体衰亡，呼吸强度减弱，溶解氧浓度也会逐步上升。菌体开始自溶后，溶解氧浓度上升更为明显。

(二) 影响氧传递的因素

微生物发酵中，通入发酵罐内的空气含有的氧不断溶于培养液中，以供菌体细胞代谢之需。这种由气态氧转变成溶解态氧的过程与液体吸收气体的过程相同，所以可用描述气体溶解于液体的双膜理论的传质公式表示：

$$N = k_L a (C^* - C_L)$$

式中： N ——氧的传递速率 (mmol/h)；

C^* ——溶液中饱和溶解氧浓度 (mmol/L)；

C_L ——溶液主流中的溶解氧浓度 (mmol/L)；

k_L ——以浓度差为推动力的氧传质系数 ($1/h$)；

a ——比表面积 (单位体积溶液所含有的气液接触面积, m^2/m^3)。

因为 a 很难测定, 所以将 $k_L a$ 当成一项, 称为液相体积氧传递系数, 又称溶(解)氧系数 ($1/h$)。

从上述公式可以看出, 影响发酵过程中供氧的主要因数有推动力 ($C^* - C_L$) 和液相体积氧传递系数 $k_L a$ 。若能改变这两个因数, 就能改变发酵罐的供氧能力。

要想增加氧传递的推动力 ($C^* - C_L$), 就必须设法提高 C^* 或降低 C_L 。

1. 提高饱和溶解氧浓度 C^* 的方法 影响氧传递推动力的因数有温度、溶液的组成、氧的分压等。因此要想提高 C^* 就得降低培养温度或降低培养基中营养物质的含量, 或提高发酵罐内的氧分压。这几种方法的实施均有较大的局限性。发酵培养基的组成和培养温度是依据生产菌种的生理特性和生物合成代谢产物的需要而确定的, 不可任意改动。但有时分批发酵的中后期, 由于发酵液黏度太大, 补入部分灭菌水来降低发酵液的表现黏度, 改善通气效果。采用提高氧分压的方法, 一是提高发酵罐压力, 二是向发酵液通入纯氧气。提高罐压会减小气泡体积, 减小了气-液接触面积, 影响氧的传递速率, 降低氧的溶解度, 影响菌体的呼吸强度, 同时增加设备负担。通入纯氧能显著提高溶液中的溶解氧浓度, 但此种方法既不经济又不安全, 同时易出现微生物的氧中毒现象。采用富集氧的方法, 如将空气通过装有吸附氮的介质的装置, 减小空气中的氮分

压。经过这种富集氧的空气用于发酵，是值得深入研究的一种提高氧分压的方法。

2. 降低发酵液中的 C_L 降低发酵液中的 C_L ，可采取减少通气量或搅拌转速等方式来降低 C_L ，使发酵液中的 C_L 降低。但是，发酵过程中发酵液中的 C_L 不能低于 $C_{临界}$ ，否则就会影响微生物的呼吸。目前发酵所采用的设备，其供氧能力已成为限制许多产物合成的主要因素之一，故此方法也不理想。

经过长时间的研究和生产实践证明，影响发酵设备的 k_La 的主要因素有搅拌效率、空气流速、发酵液的物理化学性质、泡沫状态、空气分布器形状和发酵罐的结构等。实验测出的 k_La 与搅拌效率、通气速度、发酵液理化性质等的关系可用下述的经验式表示：

$$k_La = k [(P/V)^{\alpha} \cdot (V_s)^{\beta} (\eta_{app})^{-\omega}] \quad (3-12)$$

式中： P/V ——单位体积发酵液实际消耗的功率（指通气情况下， kW/m^3 ）；

V_s ——空气直线流速（ m/h ）；

η_{app} ——发酵液表观黏度（ $\text{kg}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ）；

α 、 β 、 ω ——指数，与搅拌器和空气分布器的形式等有关，一般通过实验测定；

k ——经验常数。

(1) 搅拌效率的影响。发酵罐内装配搅拌器的作用有：①使发酵罐内的温度和营养物质浓度均一，使组成发酵液的三相系统充分混合；②把引入发酵中的空气分散成小气泡，增加了气-液接触面积，提高 k_La 值；③强化发酵液的湍流程度，降低气泡周围的液膜厚度和湍流中的流体的阻力，从而提高氧的转移速率；④减少菌丝结团，降低细胞壁周围的液膜阻力，有利于菌体对氧的吸收，同时可尽快排除细胞代谢产生的“废气”和“废物”，有利于细胞的代谢活动。应指出的是，如果搅拌速度过快，由于剪切速度增大，菌丝体会受到损伤，影响菌丝体的正常代谢，同时浪费能源。

(2) 空气流速。空气流速为 V_s 。 β 为指数，约在 0.4~0.72 间，随着搅拌形式而异。这个关系说明通气效率或 k_La 是随空气量增多而增大的。当增加通气量时，空气流速相应增加，从而增大溶解氧；但是，只增加通气量，而转速不变时，功率会降低，又会使溶氧系数降低。同时，空气流速过大时，会发生“过载”现象，这时，桨叶不能打散空气，气流形成大气泡在轴的周围逸出，使搅拌速率和溶氧速率都大大降低。

(3) 空气分布管。空气分布管的型式、喷口直径及管口与罐底距离的相对位置对氧溶解速率有较大的影响，在发酵罐中采用的空气分布装置有单管、多孔管及多孔分支管等几种。当通气量小时（0.02~0.5 mL/s ），气泡的直径与空气喷口直径的 $1/3$ 次方成正比。就是说，喷口直径越小，气泡的直径越小，溶氧系数就越大。但是，一般发酵工业的通气量都远超过这个范围，这时气泡直径与通气量有关，而与喷口直径无关，即在通气量大时，采用单管或环形管，其通气效果不受影响。但是，环形管的小孔极易堵塞，因此，发酵工业大多数采用单管空气分布器，空气分布器在搅拌器的下方，罐底中间位置，管口向上，使空气喷出就被搅拌器打碎，从而提高了通气效率。

(4) 氧的分压。增加空气中氧的分压可使氧的溶解度增大。增加空气压力，即增大罐压，或用含氧较多的空气或纯氧都能增加氧的分压。一般微生物在 0.5MPa 以下的压力不会受到损害，因此适当提高空气压力对提高溶氧效果是有好处的。但是，过分增加罐中空气压力是不值得提倡

的,因为罐压增大,空气压力增大,整个设备耐压性都要提高,从而使设备费用投资大大增加。同时,氧的分压过高也会影响菌的生理代谢,据报道氧分压过高会造成微生物暂时的中毒现象,中毒容易与否决定于微生物的种类和培养条件。而采用纯氧的办法也要考虑经济性。

(5) 发酵液的物理性质。在发酵过程中,由于微生物的生命活动,分解利用培养液中的基质、大量繁殖菌体、积累代谢产物等都会引起培养液的物理性质的改变,特别是黏度、表面张力、离子浓度等,从而影响气泡的大小、气泡的稳定性和氧的传递效率。此外,发酵液黏度的改变还影响液体的湍动性以及界面或液膜阻力,从而影响溶氧传递。特别是非牛顿型流体的霉菌的发酵液,溶氧系数和培养基组成有关。通常当发酵液浓度增大,黏度增大时,则 $k_L a$ 值降低。

发酵过程中,由于泡沫大量形成,菌体与泡沫形成稳定的乳浊液,影响了氧的传递,这种情况下加入适量的消泡剂,消除泡沫对氧的溶解有利。但是,消泡剂用量过多,消泡剂聚集在微生物细胞表面及气泡液膜,增加传质阻力,大大降低氧的传递速率。

除此之外,发酵罐内液柱高度和体积也对溶氧有影响。一般来说,罐的径高比小则氧的利用率差,罐体积大的氧的利用率高。常用溶氧控制方法的比较见表 3-15。

表 3-15 常用溶氧控制方法的比较

方法	作用于	投资	运转成本	效果	对生产作用	备注
气体成分	C^*	中到低	高	高	好	气相中高氧可能会爆炸,适于小规模
搅拌速度	$k_L a$	高	低	高	好	在一定限度内,要避免过分剪切
挡板	$k_L a$	中	低	高	好	需改装设备
通气速率	$C^* a$	低	低	低	好	可能引起泡沫
罐压	C^*	中到高	低	中		罐强度要求高,对密封、探头有影响
基质浓度	需求	中	低	高	不定	响应较慢须及早行动
温度	需求 C^*	低	低	变化	不定	不是常应用
表面活性剂	k_L	低	低	变化	不定	需试验确定

(三) 溶氧系数的测定

溶氧系数的测定方法很多,主要有①化学法;②压力法;③极谱法;④覆膜氧电极法。化学法及压力法等较为复杂,不适于在线控制。实际工业应用的一般是由极谱法发展而来的覆膜氧电极法。可以测定在发酵过程中溶解氧浓度 c 、菌的耗氧速率 r 及溶氧系数 $k_L a$ 。此外,还可根据发酵过程中基质消耗比速率 r ,间接计算出 $k_L a$ 。

1. 亚硫酸盐氧化法

(1) 作用原理。此法是利用亚硫酸根在铜或镁离子作为接触剂时被氧迅速氧化的特性来估计发酵设备中的通气效率的。因为亚硫酸盐的氧化速率远较氧的溶解速率为大,所以氧一溶解于液体中就立即被消耗掉,从而使溶液中氧浓度为零,当亚硫酸盐浓度为: $0.018 \sim 0.47 \text{ mol/L}$, 温度在 $20 \sim 45^\circ\text{C}$ 之间,与氧反应的速度几乎恒定不变,用碘量法测定未经氧化的亚硫酸钠,便可根据亚硫酸钠的氧消耗量来求得氧的溶解量。计算时,为了方便,采用罐压 P 作为推动力,同时溶液中的氧分压 P^* 等于零,此时的溶氧系数叫做亚硫酸盐氧化值,以 k_d 表示

$$k_d = \frac{N}{P} = \frac{cV}{4000Stp} \quad (3-13)$$

式中: k_d ——亚硫酸盐氧化值 [$\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min} \cdot \text{MPa})$];

- N ——平均溶氧速率 ($\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$);
 c ——亚硫酸钠的体积摩尔浓度 (mol/mL);
 S ——取样量 (mL);
 t ——两次取样的时间间隔 (min);
 V —— $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 滴定体积 (mL);
 P ——罐内绝对压力 (MPa)。

(2) 亚硫酸盐氧化法的优缺点。用亚硫酸盐氧化法测定溶氧系数的优点是氧溶解速度和亚硫酸盐浓度无关,且反应速度快,不需要特殊仪器。其缺点是不及极谱法测定准确,不能在真实发酵条件下进行测定发酵液的溶解氧,因为亚硫酸盐对微生物生长有影响,且发酵液的成分、消泡剂、表面张力、黏度,特别是菌体影响氧的传递。这方法仅能测定发酵设备的溶氧系数,只能表示发酵设备的通气效率的优劣,同时工作容积只能在 $4\sim 80\text{L}$ 以内才较可靠。

2. 极谱法 发酵液中的溶解氧可以直接取样测定,用极谱仪来测定称取样极谱法。其原理是当电解电压为 $0.6\sim 1.0\text{V}$ 时,其扩散电流的大小随液体中的溶解氧的浓度成正比变化。由于氧的分解电压最低,因此发酵液中其他物质对测定的影响甚微,且发酵液中含有氢氧化钠、磷酸盐等电解质,故可直接用来测定。

另外一种是在非发酵情况下进行的测定方法称排气极谱法。在被测定的发酵罐中充以事先用氮气驱出溶解氧的发酵液或 0.1mol/L 的 KCl 浓液。当开始通气及搅拌后,定时取出样品用极谱仪或其他溶解氧测定仪测出其溶解氧的浓度。

这两种测定方法没有考虑到氧浓度差对溶氧系数的影响,测定溶氧系数都不能反映发酵过程中的实际情况,因此要求最好能应用覆膜电极的溶解氧测定仪直接测定发酵过程的溶氧系数。

3. $k_L a$ 的覆膜电极测定和氧分析仪测定 由于亚硫酸盐氧化法、取样法和排气法都不能反映发酵过程的实际情况,因而要求探索能直接测定发酵过程的溶氧系数的有效方法。现在国内外已有应用覆膜电极直接测定发酵过程中溶氧系数的溶氧测定仪。其原理是用能透氧分子的薄膜将电极系统与被测定溶液分隔开来,因而避免了外界溶液的性质及通气搅拌引起的湍动对测定的影响。现在已制成耐高温蒸汽灭菌、灵敏度高的具有实用价值的聚全氟乙丙烯覆膜银-铅电极。

利用覆膜电极在发酵过程中测定发酵液中溶(解)氧浓度、菌体的耗氧率 r 及溶氧系数,这样测出的 r 及溶氧系数 $k_L a$ 可代表发酵过程中的实际情况,是较理想的方法。发酵过程中停止通气片刻,溶解氧浓度因菌体的利用而立即迅速下降,人为地制造一个不稳定状态(即溶氧速率和耗氧速率不平衡)来求 $k_L a$ 。不稳定状态时发酵液中某一个时间间隔的溶氧量为:

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C^* - C_L) - Q_{O_2} \cdot X \quad (3-14)$$

可改写成:

$$C_L = \left(-\frac{1}{k_L a}\right) \left(\frac{dC}{dt} + Q_{O_2} \cdot X\right) + C^* \quad (3-15)$$

当关闭空气进口阀门时,发酵液内的溶氧浓度即由 C_1 下降至 C_{q_2} , 经过时间 t_1 后再打开空气,溶氧浓度即由 C_2 上升至 C_1 , 其时间为 t_2 。这样就可以求得菌体的耗氧速率:

$$r = Q_{O_2} \cdot X = \frac{C_1 - C_2}{t_1} \quad (3-16)$$

$$\frac{dC_L}{dt} = \frac{C_1 - C_2}{t_2} \quad (3-17)$$

这里假定发酵液中溶解氧浓度的变化并不影响微生物的呼吸速率。用此法不仅能求出菌的耗氧速率 r ，还可由方程式 (3-12) 求得溶氧系数 $k_L a$ 。

用氧分析仪测定进口气体中氧的分压 P_1 和出口气体中氧的分压 P_2 ，可测定和计算气膜体积溶氧系数 $k_L a$ 。

三、pH 对发酵的影响及控制

pH 对微生物的生长繁殖及代谢产物的形成和积累都有很大影响。不同种类的微生物对 pH 的要求不同。大多数细菌的最适生长 pH 为 6.5~7.5，霉菌一般为 pH 4.0~6.0，酵母为 pH 3.0~6.0，放线菌为微碱性 pH 7~8。还有一些嗜碱或嗜酸的微生物。微生物生长 pH 可以分为最低、最适和最高三种。低于最低生长 pH 或高于最高生长 pH，微生物就不能生长，生命活动就要停止或死亡。最适生长 pH 是指微生物生长最适宜的 pH，在这个 pH 时，微生物生长最快。最适发酵 pH 则是在该 pH 下最适于微生物的生长或发酵产物的生成。同一种微生物菌体生长的最适 pH 和形成代谢产物的最适 pH 可能相同也可能有所不同。

pH 对微生物的生长繁殖和代谢产物形成的影响主要有以下几方面：① pH 影响酶的活性，pH 过高或过低能抑制微生物体内某些酶的活性，使得微生物细胞生长和代谢受阻。② pH 的改变往往引起某些酶的激活或抑制，使菌体代谢途径发生改变，代谢产物发生变化。例如，黑曲霉在 pH 2~3 时合成柠檬酸，在 pH 接近中性时积累草酸；谷氨酸生产菌在中性和微碱性条件下积累谷氨酸，在酸性条件下形成谷氨酰胺和 N-乙酰谷氨酰胺。③ pH 影响微生物细胞膜所带电荷状态，从而改变细胞膜的渗透性，影响微生物对营养物质的吸收和代谢产物的排泄。④ pH 影响培养基中某些营养物质和中间代谢产物的离解，从而影响微生物对这些物质的利用。⑤ pH 还对氧的溶解、氧化还原电位、营养物的物理状态等都有影响。因此发酵过程中要正确控制和调节 pH。

(一) 影响发酵过程 pH 变化的因素

发酵过程中 pH 的变化决定于菌种的特性、培养基的组成和培养条件。发酵过程中随着微生物对培养基中的营养物质的利用以及代谢产物的积累，发酵液的初始 pH 会发生一定的变化。一般情况下，在适合于微生物生长及产物合成的环境下，微生物本身具有一定的 pH 调节能力，会使 pH 处于比较适宜微生物生长的状态。因此，发酵过程 pH 的变化是有一定规律性的。一般来说，处于对数生长期的菌体发酵液的 pH 变化较大，因为菌体在利用营养物质时或是释放一些酸性物质使得 pH 下降，如葡萄糖利用过程中产生的有机酸；或是释放一些碱性物质使得 pH 上升，如蛋白胨利用过程中产生的铵离子。而处于产物合成期的发酵液的 pH 相对稳定些。菌体自溶阶段，随着基质的耗尽、菌体蛋白酶的活跃，培养液中氨基氮增加，致使 pH 又上升，此时菌丝趋于自溶而代谢活动终止。但是工业发酵为了大量获得目标产物，往往有意识改变发酵液的 pH。

影响发酵液 pH 变化的因素较多，引起发酵液 pH 下降的因素主要有：① 培养基中 C/N 比高，即碳源过多，特别是葡萄糖过量，或者中间补糖过多而使 pH 下降。溶解氧不足，糖和脂肪

氧化不完全,致使有机酸大量积累而使 pH 下降。②消泡油加得过多而使 pH 下降。③生理酸性物质过多,如硫酸铵作无机氮源,铵离子被利用,pH 下降。引起发酵液 pH 上升的因素主要有:①培养基中 C/N 比低,氮源过多,氨基氮释放,使 pH 上升。②生理碱性物质过多,如 NaNO_3 作氮源, NO_3^- 被吸收后,pH 上升。③中间补料时氨水或尿素等碱性物质的加入量过多,pH 也上升。另外,发酵过程中污染杂菌也会引起 pH 的变化,如酿酒过程中乳酸菌污染,pH 值下降;通气发酵时若污染细菌,pH 也会上升。

(二) 发酵过程 pH 的控制

pH 值对微生物生长繁殖和代谢产物的合成都有极大的影响,因此,为了使微生物能在最适的 pH 范围内生长、繁殖和发酵,首先应根据不同微生物的特性,不仅在原始培养基中要控制适当的 pH,而且整个发酵过程中,必须随时检测 pH 的变化情况,然后根据发酵过程中的 pH 要求,选用适当的方法对 pH 进行适当的调节和控制。

pH 值调节和控制的方法应根据实际生产情况加以分析,再做出选择。pH 调节和控制的方法主要有:①调节培养基的原始 pH,或加入缓冲物质,如磷酸盐、碳酸钙等,制成缓冲能力强、pH 变化不大的培养基。②选用不同代谢速度的碳源和氮源种类和比例。③在发酵过程中加入弱酸或弱碱进行 pH 的调节,进而合理地控制发酵过程。④也可通过调整通气量来控制 pH。

另外,补料也是一个较好的办法,它既调节了培养液的 pH,又可补充营养,增加培养液的浓度和减少阻遏作用,进一步提高发酵产物的产率。通过补料调节 pH 的方法已在工业发酵过程中取得了明显的效果。采用生理酸性铵盐作为氮源时,由于 NH_4^+ 被微生物利用后,剩下的酸根会引起发酵液 pH 的下降,在培养液中可加入碳酸钙来调节 pH;在发酵过程中根据 pH 变化流加氨水或液氨调节 pH,同时还作为氮源。谷氨酸、糖化酶发酵生产中多用此法控制 pH。流加尿素法,譬如在谷氨酸发酵过程中,由于菌体对培养基营养成分的利用和代谢产物的积累,使培养液的 pH 不断变化。首先,尿素被分解放出氨,使 pH 升高,氨被菌体利用以及糖被利用生成有机酸等中间代谢产物使 pH 下降,谷氨酸的形成耗用大量的氨也使 pH 下降。因此,要不断补充氮源和调节 pH。当流加尿素后,尿素被尿酶分解放出氨使 pH 上升,氨被利用和产物形成又使 pH 下降,这样反复进行直至发酵结束。

目前在发酵控制上可以利用 pH 电极在线连续测定发酵液的 pH,并可反馈自动添加酸或碱来调节 pH,并控制在最适的范围内。

四、二氧化碳对发酵的影响及控制

(一) 二氧化碳对发酵的影响

二氧化碳既是微生物的代谢产物,也是某些微生物代谢的基质。通常二氧化碳对生长具有直接影响,当排出的二氧化碳浓度高于 4% 时,碳水化合物的代谢及微生物的呼吸速率下降。对酵母生长的研究发现,发酵液中二氧化碳浓度为 $1.6 \times 10^{-2} \text{mol}$ 时,会严重影响酵母的生长。而大肠杆菌和链孢霉突变株的生长因子,有时需含 30% 的二氧化碳气体,菌体才能生长。溶解在发酵液中的二氧化碳对氨基酸、抗生素等发酵有刺激或抑制作用。例如在精氨酸发酵中,必须保持 $0.12 \times 10^5 \text{Pa}$ 分压的二氧化碳,高于或低于此浓度的二氧化碳含量都会降低精氨酸的产量。而在

红霉素发酵中,二氧化碳有明显抑制作用,当从发酵 15h 起,按进气量的 11% 导入二氧化碳,红霉素产量减少 60%,而生产菌生长不受影响。可以通过对排气中二氧化碳含量的测定,来估算细胞生长速率和细胞量,控制发酵过程。

二氧化碳和 HCO_3^- 都能影响细胞膜的结构,它们分别作用于细胞膜的不同位点。溶解于发酵液中的二氧化碳主要作用于细胞膜的脂肪酸核心部位,而 HCO_3^- 则主要通过通过对磷脂及细胞膜表面蛋白质的影响起作用。当细胞膜的脂质中二氧化碳浓度达到临界值时,膜的流动性及表面电荷密度就会发生改变,使许多基质的膜运输受阻,影响细胞膜运输效率,导致细胞处于一种“麻醉”状态,细胞生长受到抑制,形态也发生改变。二氧化碳溶于发酵液中形成碳酸,还会造成发酵液 pH 的改变,从而影响菌体的生长和代谢。

(二) 发酵过程中二氧化碳浓度的控制

二氧化碳在发酵液中的浓度受到培养基性质、菌种、工艺等多种因素的影响。在大规模发酵中,二氧化碳对发酵的影响是一个突出的问题,因为发酵罐中的二氧化碳分压是液体深度的函数,发酵罐底部的二氧化碳分压远高于发酵罐顶部。为了控制二氧化碳的影响,必须综合考虑二氧化碳在发酵液中的溶解度、温度、通气情况等因素。在发酵过程中如遇到泡沫上升而引起逃液时,如采用增加罐压的方法消泡,这将增加二氧化碳的溶解度,对菌体生长有影响。

如前所述,不同的菌种,不同工艺的发酵,二氧化碳的影响也不同,有的对合成产物有刺激作用,有的则有抑制作用。因此,对二氧化碳的控制也应视具体情况而定,如果对发酵有利,则应设法提高二氧化碳的浓度,反之,则尽可能降低其浓度。一般工业上采用通气搅拌的方法来控制二氧化碳浓度。通气不仅能增加溶氧,而且可以使发酵过程中产生的二氧化碳不断排出。降低通气量和搅拌速率,有利于增加二氧化碳在发酵液中的溶解度;反之,则会降低二氧化碳的溶解度。对于二氧化碳溶于发酵液中产生的碳酸造成 pH 下降的问题,可以用碱中和,但不能使用碳酸钙。

五、发酵过程的中间补料控制

发酵过程可以分为分批发酵、分批补料发酵和连续发酵。分批发酵是指发酵时一次投料,中间不再补加营养物质,直到发酵结束。分批发酵方法工艺和操作简单,是广泛采用的培养方式。但是对许多发酵产品,特别是一些次级代谢产物的发酵,到中后期往往因培养基营养的缺乏,菌体容易衰老自溶,影响发酵单位和产量。如果采用高浓度的营养丰富的培养基,可能对微生物生长不利,也可能因培养基浓度太高,影响细胞膜内渗透压而无法生长;对发生基质抑制或异化代谢物阻遏的培养过程,则会产生基质抑制或分解代谢产物阻遏作用,如淀粉酶的发酵中,葡萄糖浓度过高时,会抑制淀粉酶的产生,发酵液酶的活力不高。另外,发酵液浓度过高,黏度增大,通气搅拌困难,溶解氧浓度难以提高,发酵难以进行。为此,现代发酵工厂很多都采用分批补料发酵工艺,如谷氨酸、赖氨酸、酶制剂、有机酸、抗生素等均采用补料措施。在工业生产上,补料还经常作为纠正异常发酵的一个重要手段。

补料,是指发酵过程中补充某些维持微生物的生长和代谢产物积累所需要的营养物质。补料的目的就在于控制微生物的中间代谢,使之向着有利于产物积累的方向发展,延长产物的分泌期,推迟菌体的衰老,降低培养液中限制性基质的抑制作用,大幅度提高产量。为此,要根据菌

体的生长代谢、生物合成途径,利用中间补料调节发酵过程,让生物合成阶段有足够而又不过多的养料供给其合成和维持正常代谢的需要。

补料主要是补充碳源、氮源、无机盐、微量元素和前体。

(一) 补充碳源

碳源的浓度对发酵有明显影响,碳源过多容易引起菌体异常增殖,菌体的代谢、产物的合成会受到明显的抑制。反之,碳源不足,仅仅供给维持量的碳源,菌体生长和产物合成都会减慢甚至停止。因此,控制适量的碳源浓度,对发酵工业是很重要的。控制碳源的浓度,可采用经验性方法和动力学方法,以及在发酵过程中采用中间补料的方法来控制。例如谷氨酸生产菌 ATCC₁₃₈₆₉,当发酵初糖为 60g/L,流加糖浓度控制在 20~40g/L 时,总糖达 200g/L,谷氨酸浓度达 93g/L,转化率为 46.3%。当改为初糖浓度 5g/L,流加糖浓度控制在 2~5g/L,总糖为 198g/L,谷氨酸浓度达 100g/L,转化率 51%(提高了 10%)。总之,补充碳源要根据培养基使用碳源的种类、用量和消耗速度、pH 的变化、菌种特性、发酵过程中菌体生长和产物形成的情况等因素综合考虑。

(二) 补充氮源

发酵时除了培养基中的氮源外,往往还需中途补加氮源来控制氮的浓度,同时也起到调节 pH 的作用。根据发酵情况,在发酵过程中添加某些无机氮源如氨水等,既可补充氮源又可起到调节 pH 的作用。补充有机氮源,在某些发酵过程中补充酵母粉、玉米浆等有机氮源可以有效提高发酵单位。在谷氨酸发酵中,由于 pH 持续下降,对菌体生长不利,因此必须定时流加尿素或氨水,将 pH 控制在适宜的范围,保证生产正常进行。

(三) 补充微量元素和无机盐

根据发酵代谢的具体情况,有时还需要补加某些具有调节生长代谢作用的因子,如磷酸盐、硫酸盐、钙、镁、锌、生物素等。

为避免中间补料对菌体发酵造成抑制或阻遏,每次补料的量应适量,以少量多次为好。在国内,大多采用人工控制补料,而且为了管理方便,采用延长间隔时间的办法,有间隔 2h 甚至 1d 补料一次的。补料间隔时间越长,一次加入的基质越多,造成的抑制或阻遏作用越大,这种方式是不合理的。采用在线检测,计算机控制补料,则可以达到最佳的补料效果。

(四) 补充前体

一些生物合成的前体物质对微生物的生长有抑制作用,浓度高时会产生毒性。而且前体主要是用于产物的合成,与菌体生长关系不大。因此多在菌体生长到一定阶段时,通过补料形式加入培养液中,以减轻毒性,提高利用率。

六、泡沫控制

(一) 发酵过程中泡沫的产生及对发酵的影响

通气发酵过程中,培养液中含有蛋白质等易起泡物质,由于通气、搅拌和产生的大量二氧化碳,会形成泡沫。培养基的组成、菌种的性能及通气和搅拌的强弱,都会对于泡沫的形成产生很大影响。发酵原料中的豆粕、花生饼粉、酵母粉、蛋白胨、玉米浆等蛋白质含量高,水解到一定分子量小时,起泡性非常好。葡萄糖等本身起泡能力很低,但丰富培养基中浓度较高的糖类增加了培

培养基的黏度 起到稳定泡沫的作用。糊精含量多也会引起泡沫的形成。另外,细菌本身有稳定泡沫的作用。特别是当感染杂菌和噬菌体时,泡沫特别多。发酵条件不当,菌体自溶时泡沫也会增多。泡沫过多就会对发酵产生影响,会引起发酵液溢出排气口,从而造成逃液,并容易引起污染,泡沫上升到罐顶,可能从轴封渗漏,造成杂菌污染,泡沫会减少发酵罐的装料系数,降低设备利用率;泡沫影响通气搅拌效果及氧传递;当泡沫稳定,难以消除时,代谢产生的气体不能及时排出,影响菌体正常呼吸作用,使产量下降。因此,必须控制发酵过程中产生的泡沫,使发酵过程得以正常进行。

(二) 泡沫的消除

为将泡沫控制在一定范围内,就需要采取消泡措施,发酵过程中常用的消泡方法主要有机械法、化学法两种。

1. 机械法消泡 机械消泡就是靠机械力打碎泡沫或改变压力,促使气泡破裂。机械消泡的优点在于不需要加入其他物质,从而减少了染菌机会和对下游工艺的影响。其缺点在于不能从根本上消除引起泡沫稳定的因素;消泡效果也较化学法差;同时还需要特定的设备和消耗动力。机械消泡装置类型有:耙式消泡器、刮板式消泡器、涡轮式消泡器、射流消泡器、碟片式消泡器、离心式消泡器等。下面介绍耙式消泡器和碟片式消泡器。

(1) 耙式消泡桨。耙式消泡器是一种结构较为简单的罐内机械消泡装置,常用的耙式消泡桨结构如图 3-4 所示。其工作机理是将其安装在搅拌轴上,桨上的齿略高于液面,靠轴的转动带动桨旋转打碎泡沫。耙式消泡器适用于泡沫较少的发酵过程。当泡沫较多,耙桨不能及时打碎,泡沫超过耙桨时,就将失去消泡作用。

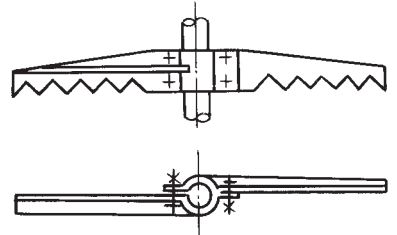


图 3-4 耙式消泡桨

(2) 碟片式消泡器。碟片式消泡器的主要部件为碟片,其数目为 4~6 个,碟片的斜角为 35° 。碟片式消泡器安装在发酵罐的顶部,当泡沫与碟片接触时,泡沫受碟片的离心力作用,将泡沫破碎分离成液态和气态两相,气相沿碟片向上,通过通气孔沿空心轴向上排出,液体则被甩回发酵罐中而达到消泡的目的。碟片式消泡器消泡效果好,能耗小(较卧式刮板消泡器节能 60%~75%),但其结构复杂,加工比较麻烦。

2. 化学法消泡 化学消泡是一种使用化学消泡剂进行消泡的方法。其优点是消泡效果好,作用迅速,用量少,不耗能,也不需要改造现有设备。这是目前应用最广的消泡方法。

发酵液中加入的消泡剂,起着破泡和抑制泡沫产生的作用。所谓破泡作用是因为消泡剂为表面活性剂,当其加入到发酵体系中,由于消泡剂本身的表面张力相对于发酵体系来说是比较低的,所以当其接触到气泡表面时,就会造成气泡膜局部表面张力降低,力的平衡受破坏,在力的作用下气泡破裂、合并,最后导致泡沫破裂。抑制泡沫产生主要是因为加入的消泡剂除去了发泡剂的吸附层,而其自身优先吸附。发酵体系中吸附了消泡剂的发酵液,由于表面黏度在局部地方显著降低,该部分气泡液膜就容易破裂。

发酵工业上使用的消泡剂必须具备以下条件:①消泡剂必须是表面活性剂,具有较低的表面张力;②具有一定的亲水性,对气-液界面的铺展系数足够大,能迅速发挥消泡活性;③在水中的溶解度必须较小,以保持长久的消泡能力;④无毒,不影响菌体生长和代谢;⑤不影响氧在培

养液中的溶解和传递；⑥具有良好热稳定性；⑦来源方便、广泛，价格便宜。

发酵工业上常用的消泡剂主要有：①天然油脂类（花生油、玉米油、菜子油、鱼油、猪油等）；②聚醚类（GPE、PPE、SPE等）；③醇类（聚二醇、十八醇等）；④硅酮类（主要是聚二甲基硅氧烷及其衍生物）；⑤氟化烷烃类。天然油脂类消泡剂消泡效率不高，用量很大，目前生产上多用化学消泡剂来代替。通常称为“泡敌”的聚醚类化学消泡剂广泛应用于酶制剂、氨基酸、维生素、抗生素等的发酵。

在发酵过程中消泡的效果除了与消泡剂的种类、性质、分子量大小、消泡剂亲水亲油基团等有密切联系外，还与消泡剂的浓度、加入方法和温度等有很大关系。消泡剂可在基础料中一次加入，然后连同培养基一起灭菌，此法操作简便但消泡剂用量较大。也可将消泡剂配制成为一定浓度，经灭菌、冷却后在发酵过程中根据泡沫的消长情况分次加入。此法能充分发挥消泡剂作用，用量较少，但操作复杂，易造成杂菌污染。此外，还可通过机械分散及加入载体和乳化剂等方法增强消泡剂的作用。

七、发酵终点判断

发酵终点的判断，对提高产量和经济效益都是很重要的。发酵过程中产物的合成，有的随菌体生长而增加，如菌体蛋白和初级代谢产物如氨基酸等；有的则与菌体生长无明显关系，如抗生素、类胡萝卜素等次级代谢产物。但无论哪种类型的发酵，到了一定时期，由于菌体的衰亡，分泌能力下降，使得产物合成能力下降，甚至会由于菌体自溶释放出分解酶类破坏已合成的产物。如有些酶制剂生产中，由于蛋白酶的水解作用而使其他酶水解失活，发酵单位因而随时间延长而明显下降。因此，必须综合考虑各种因素，确定合理的放罐时间。

发酵时间长短对后续工艺和产品质量有很大影响。如果发酵时间太短，势必会有过多的剩余营养物质，如各种糖类、蛋白、脂肪等残留在发酵液中，这些物质对于发酵产物的提取纯化都会造成不利影响。如果发酵时间太长，则由于菌体自溶，释放出菌体蛋白及各种酶类，改变发酵液的性质或破坏产物。这些影响都会造成产品收率下降，因此必须把握合适的发酵周期。

一般来说，对于发酵原料占整个生产成本主要部分的发酵品种，主要追求生产率($\text{kg}/\text{m}^3 \cdot \text{h}$)、得率(kg 产物/ kg 基质)的提高。但对于下游提取纯化工序占成本主要部分的发酵品种，则除了要考虑提高生产率和得率外，还要求有较高的产物浓度，以降低整个产品的生产成本。

对于成熟的发酵工艺，放罐时间一般都根据作业计划放罐，但是在发酵异常的情况下，则需根据具体情况，确定放罐时间。例如当发现发酵液染菌时，则放罐时间就需当机立断，以免倒罐，造成更大损失。

另外，临近发酵终点，加糖、补料或补消泡剂都要慎重，因过多的残留物对后续工艺有影响。判断放罐的指标有：产物产量、残糖、氨基氮含量、菌体形态、pH、发酵液外观、过滤速度、黏度等。发酵终点的掌握，就要综合考虑这些参数来确定。

八、发酵过程计算机控制

按发酵动力学原理对发酵过程进行控制，首先必须了解达到高产所必须具备的产生菌生长状

态（生长速率、形态、浓度等）、相应的基质和氧的需要率以及各种发酵条件对这种生长状态和需要率的影响。这涉及许许多多数据的采集、处理、综合运算和参数估计，因此，在当前工业化生产的规模上，计算机控制作为一种简单、快速、实时、有效的控制手段越来越受到重视并应用于发酵过程控制中。在发酵过程中的计算机控制，可分为在线操作和离线操作两种方式。前者是将微机通过接口与发酵罐上的传感器连接，将传感器测得的参数经过模/数转换和信号变送进行显示，也可以将测得的数据与给定值进行比较，并通过计算给出控制信号，再经数/模转换，将其送入执行机构进行实时反馈控制。所以在线控制又称为联机操作。离线操作又称为离机操作，它是把计算结果提供给生产人员作为控制生产的参数，而过程的调节仍靠操作者执行。图 3-5 是计算机控制调节发酵罐操作示意图。

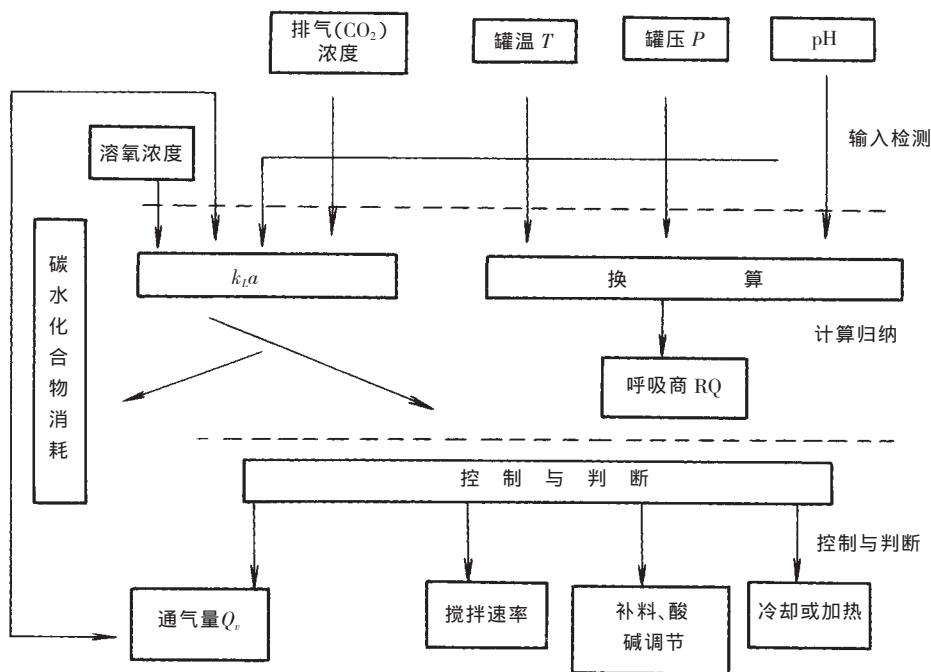


图 3-5 发酵过程中的计算机控制

利用从感应器得来的所有关于发酵程序的资料 and 额外的输入及储存的计算数据，计算机可执行下列程序控制：①简单监视；②分批或补料分批培养的程序控制自动化；③个别程序参数的控制；④程序最适化；⑤发酵过程的远程控制。

以上最初两项计算机的控制工作包括警报信号、仪器设备之校正、超越安全界限时的机器运转之停止、从运转开始到休止的种种重复操作步骤的联结（如培养基进料、杀菌的加热、冷却、取样、出料、菌体与产物的分离等）。

计算机在发酵控制上的应用，无疑会日益普及。虽然，计算机控制与程序最适化由于缺乏不少精确可靠的传感器而未能达到完全利用，但是，今后期待能继续不断地开发种种新型传感器，以有效地配合计算机控制领域的应用与开发，使发酵程序亦能精益求精达到完全控制的境界，提

升发酵技术的应用层次。

第六节 微生物发酵动力学

一、发酵动力学概论

发酵动力学是发酵工程的一个重要组成部分，它以化学热力学（研究反应的方向）和化学动力学（研究反应的速度）为基础，研究发酵过程中菌体生长、基质消耗、产物形成的动态平衡及其内在规律。

发酵动力学的研究内容主要包括：细胞生长和死亡动力学、基质消耗动力学、氧消耗动力学、二氧化碳生成动力学、产物合成和降解动力学、代谢热生成动力学。以上各个方面不是孤立的，而是既相互依赖又相互制约，构成错综复杂的发酵动力学体系。研究发酵动力学有以下几个步骤：首先，获得发酵过程变化的第一手资料，要尽可能寻找反映过程变化的各种理化参数。其次，将各种参数变化和现象与发酵代谢规律联系起来，找出它们之间的相互关系和变化规律。第三，建立各种数学模型以描述各参数随时间变化的关系。第四，通过计算机的在线控制，反复验证各种模型的可行性与适用范围。从而通过以上各步骤，获得发酵最优化控制。这一研究，有助于我们更加深入地认识和掌握发酵过程，进行最佳发酵工艺的控制。

根据微生物的生长和培养方式，发酵过程可以分为分批培养、补料分批培养和连续培养三种类型。发酵过程动力学分类：①根据产物形成与基质消耗关系，可分为：a. 产物形成直接与基质（糖类）消耗有关；b. 产物形成与基质（糖类）消耗间接有关；c. 产物形成显然与基质（糖类）消耗无关。②根据生长有否偶联，可分为：a. 偶联型，产物形成速度与生长速度有紧密联系；b. 混合型，产物形成与生长只有部分联系；c. 非偶联型，产物形成速度与生长速度无紧密联系。③根据反应进程，可分为：a. 简单型，营养成分以固定的化学量转化为产物，无中间物积累；b. 并行型，营养成分以不定的化学量转化为一种以上的产物，且产物生成速度随营养成分浓度而异，也无中间物积累；c. 串联型，形成产物前积累有一定程度的中间物的反应；d. 分段型，营养成分在转化为产物前全转变为中间物或以优先顺序选择性地转化为产物，反应过程由两个得意反应段组成；e. 复合型，大多数发酵过程是一个复杂的联合反应。图 3-6 定性地表示

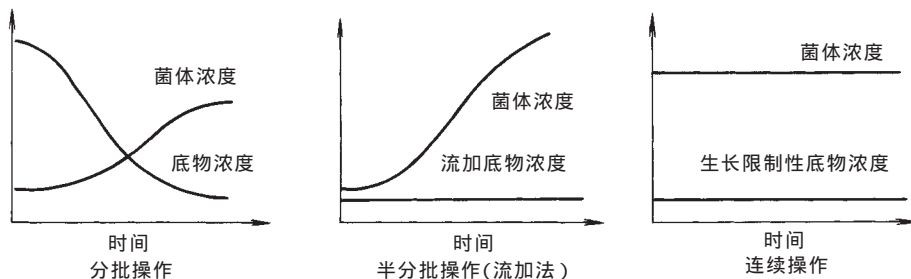


图 3-6 分批、补料及连续操作时菌体及底物的浓度随时间的变化

了分批、补料分批及连续操作时菌体及底物的浓度随时间的变化情况。目前工业上所用的微生物反应系统，大部分为分批或补料分批操作。

二、分批培养动力学

(一) 分批培养

分批培养又称分批发酵，是指在一个密闭系统内一次性投入有限数量营养物质后，接入少量的微生物菌种进行培养，使微生物生长繁殖在特定的条件下只完成一个生长周期的微生物培养方法。该法在发酵开始时，将微生物菌种接入已灭过菌的培养基中，在微生物最适宜的培养条件下进行培养，在整个培养过程中，除氧气的供给、发酵尾气的排出、消泡剂的添加和控制 pH 需加入酸或碱外，整个培养系统与外界没有其他物质交换。分批培养过程中随着培养基中的营养物质的不断减少，微生物生长环境条件也随之不断变化，因此，微生物分批培养是一种非稳态的培养方法。

在分批培养过程中，随着微生物细胞和底物、代谢物的浓度等不断变化，微生物的生长可分为延滞期、对数期、稳定期和衰亡期四个阶段，图 3-7 为典型的细菌生长曲线。

1. 延滞期 延滞期是微生物细胞适应新环境的过程。此时，微生物细胞从一个培养基被转移至另一个培养基中，细胞需要有一个适应过程。在该过程中，系统的微生物细胞数量并没有增加，处于一个相对的停止生长的状态。但细胞内却在诱导产生新的营养物质运输系统，可能有一些基本的辅助因子会扩散至细胞外，同时参与初级代谢的酶类再调节状态以适应新的环境。

实际上，微生物的生理状态和浓度是决定延滞期长短的关键。如果接种物处于对数生长期，那么就很有可能不存在延滞期，微生物细胞立即开始生长。反过来，如果接种物本身已经停止生长，那么微生物细胞就需要有更长的延滞期，以适应新的环境。

2. 对数期 处于对数期的微生物细胞的生长速度大大加快，单位时间内细胞的数目或重量的增加速度维持恒定，并达到最大值。如在半对数纸上用细胞数目或细胞重量的对数值对培养时间作图，将可得到一条直线。在对数生长期，随着时间的推移，培养基中的成分不断发生变化，但此期间，细胞的生长速度基本维持恒定，其生长速度可用数学方程表示：

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (3-18)$$

式中： X ——细胞浓度 (g/L)；

t ——培养时间 (h)；

μ ——细胞的比生长速度 ($1/h$)。

当 $t=0$ 时，细胞的浓度为 X_0 (g/L)，上式积分后即为

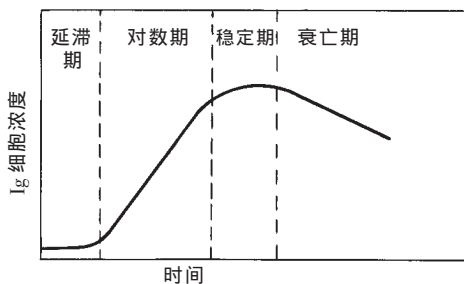


图 3-7 典型的细菌生长曲线

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t \quad (3-19)$$

于是，用微生物细胞浓度的自然对数对时间作图，就可得到一条直线，该直线的斜率就等于 μ 。微生物的生长有时也可用“倍增时间” (t_d) 来表示，“倍增时间” (t_d) 定义为微生物细胞浓度增加一倍所需要的时间，即：

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu} \quad (3-20)$$

随着细胞的大量繁殖，培养基中的营养物质迅速消耗，加之有害代谢物的积累，细胞的生长速率逐渐下降，进入减速期。当培养液中不存在抑制细胞生长的物质时，细胞的比生长速率和限制性基质浓度 S 有如下关系：

$$\mu = \frac{\mu_m S}{k_S + S} \quad (3-21)$$

式中： S ——限制性基质浓度 (mol/m^3)；

μ_m ——最大比生长速率 (h^{-1})；

k_S ——饱和常数 (mol/m^3)。

该方程式称为 Monod 方程，它的形式和米氏方程十分相似，是一个经验式。当限制性基质浓度很低时，增加该基质浓度可明显提高细胞的比生长速率，但若该基质浓度与 k_S 相比已相当高时，再增大其浓度就不能明显地增加细胞的比生长速率。这时，细胞的比生长速率接近“饱和”。除了 Monod 方程，还有许多有关细胞比生长速率与限制性基质浓度关系的方程，如

$$\mu = \mu_m [1 - \exp(-S/k_S)] \quad (3-22)$$

$$\mu = \mu_m \frac{S^n}{k_S + S^n} \quad (3-23)$$

$$\mu = \mu_m \frac{S}{k_S X + S} \quad (3-24)$$

其中 n 和 X 分别为常数和细胞浓度。由于 Monod 方程比较简单，在多数情况下都可得到满意的结果，所以应用相当普遍。

微生物细胞的比生长速率和倍增时间因受遗传特性及生长条件的控制，有很大的差异。影响指数微生物倍增代时间的因素很多，主要有：①菌种，不同菌种的代时差别极大。②营养成分，同一种细菌，在营养物丰富的培养基中生长，其代时较短，反之则长。③营养物浓度，营养物的浓度可影响微生物的生长速率和总生长量。在营养物浓度很低的情况下，营养物的浓度才会影响生长速率，随着营养物浓度的逐步增高，生长速率不受影响，而只影响最终的菌体产量。如果进一步提高营养物的浓度，则生长速率和菌体产量两者均不受影响。凡是处于较低浓度范围内，可影响生长速率和菌体产量的营养物，就称生长限制因子。④培养温度，温度对微生物的生长速率有极其明显的影响。但应该指出的是，并不是所有微生物的生长速度都符合上述方程。如当用碳氢化合物作为微生物的营养物质时，营养物质从油滴表面扩散的速度会引起对生长的限制，使生

长速度不符合对数规律。某些丝状微生物的生长方式是顶端生长，营养物质在细胞内的扩散限制也使其生长曲线偏离上述规律。

3. 稳定期 在微生物的培养过程中，随着培养基中的营养物质的消耗和代谢产物的积累或释放，微生物的生长速度也就随之下降，直至停止生长。当所有微生物细胞停止分裂或细胞增加的速度与死亡的速度相当时，微生物的数量就达到平衡，微生物的生长也就进入了稳定期。在微生物生长的稳定期，细胞的重量基本维持稳定，但活细胞的数量可能下降。

由于细胞的溶解作用，一些新的营养物质，诸如细胞内的一些糖类、蛋白质等被释放出来，又作为细胞的营养物质，从而使存活的细胞继续缓慢地生长，出现通常所称的二次（或隐性）生长。

4. 衰亡期 当发酵过程处于衰亡期时，微生物细胞内所储存的能量已经基本耗尽，细胞开始在自身所含的酶的作用下死亡。

需要注意的是，微生物细胞生长的延滞期、对数生长期、稳定和衰亡期的时间长短取决于微生物的种类和所用的培养基。

（二）微生物生长与产物形成动力学

微生物生长与产物形成动力学可分为偶联型、非偶联型和混合型，其动力学模型见图 3-8。

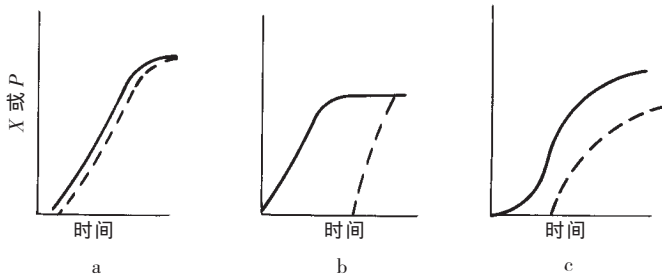


图 3-8 分批发酵中微生物生长和产物形成的动力学模式

a. 偶联型 b. 非偶联型 c. 混合型

1. 偶联型 产物形成速率与细胞生长速率有紧密联系，合成的产物通常是分解代谢的直接产物，如葡萄糖厌氧发酵生成乙醇，或者好气发酵生成中间代谢物（氨基酸或维生素）。这类初级代谢产品的生产速率与生长直接有关，如下式：

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \frac{dX}{dt} = Y_{P/X} \mu X \quad \text{或} \quad q_P = Y_{P/X} \mu \quad (3-25)$$

式中： $Y_{P/X}$ ——系以菌体细胞量为基准的产物生成系数（g/g 细胞）；

P ——产物浓度（g/L）；

X ——菌体浓度（g/L）；

μ ——比生长速率（1/h）；

q_P ——产物比合成速率（1/h）；

$\frac{dP}{dt}$ ——产物合成速率（g/L·h）；

$\frac{dX}{dt}$ ——细胞生长速率（g/L·h）。

2. 非偶联型 在生长和产物无关联的发酵模式中，产物合成发生在生长停止之后（即产生于次级生长），故习惯上把这类与生长无关联的产物称为次级代谢产物。但不是所有次级代谢产物一定是与生长无关联的。大多数抗生素和微生物毒素的发酵都是非生长偶联的例子。非偶联型发酵的生产速率只与已有的菌体量有关，而生产（产物）比速为一常数，与比生长速率没有直接关系。因此，其产率和浓度高低取决于细胞生长期结束时的生物量。

3. 混合型 在生长与产物形成只有部分联系的发酵过程中（如乳酸、柠檬酸、谷氨酸等的发酵），发酵产物形成速率可由下式描述：

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \frac{dX}{dt} + \beta' X = Y'_{P/X} \mu X + \beta' X \quad \text{或} \quad q_P = Y'_{P/X} \mu + \beta' \quad (3-26)$$

式中： $Y'_{P/X}$ ——与生长关联的产物形成系数（g/g 细胞）；

β' ——非生长关联的比生产速率 [g/(g 细胞·h)]；

$\frac{dP}{dt}$ ， $\frac{dX}{dt}$ ， μ ——表示意义同前。

该复合模式复杂的形成是将常数 $Y'_{P/X}$ 、 β' 作为变数，它们在分批生长的四个时期分别具有特定的数值。

(三) 根据产物形成与基质消耗的动力学

1. 类型 I 产物的形成直接与基质（糖类）的消耗有关，这是一种产物合成与利用糖类有化学计量关系的发酵，糖提供了生长所需的能量。糖耗速度与产物合成速度的变化是平行的，如酵母菌生长和产物合成是平行的过程；在通气条件下培养酵母时，底物消耗的速度和菌体细胞合成的速度是平行的。这种形式也叫做有生长联系的培养。

2. 类型 II 产物的形成间接与基质（糖类）的消耗有关，例如柠檬酸、谷氨酸发酵等。即微生物生长和产物合成是分开的，糖既供应生长所需能量，又充作产物合成的碳源。但在发酵过程中有两个时期对糖的利用最为迅速，一个是最高生长时期，另一个是最大产物合成时期。如在用黑曲霉生产柠檬酸的过程中，发酵早期糖被用于满足菌体生长，直到其他营养成分耗尽为止。然后代谢进入使柠檬酸积累的阶段，产物积累的数量与利用糖分数量有关，这一过程仅得到少量的能量。

3. 类型 III 产物的形成显然与基质（糖类）的消耗无关，例如青霉素、链霉素等抗生素发酵。即产物是微生物的次级代谢产物，其特征是产物合成与利用碳源无准量关系。产物合成在菌体生长停止及底物被消耗完以后才开始。此种培养类型也叫做无生长联系的培养。

图 3-9 表示各种发酵动力学类型。纵坐标表示生长比速、底物消耗比速与产物比速，横坐标表示时间。该图清楚地显示了前述三种发酵动力学类型的特征，即类型 I，产物合成与菌体的增值是平行的；类型 III，产物合成产生于菌的增值停止以后；类型

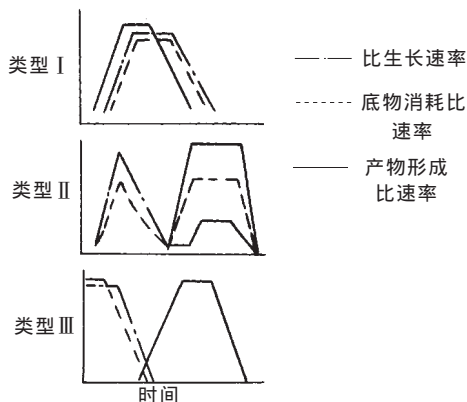


图 3-9 发酵动力学类型

II, 发酵分成长菌期和产物合成期两个快速利用底物阶段。

图 3-10 表示了一个典型的分批发酵过程, 其产物不是细胞本身。纵坐标分别为微生物细胞浓度 X , 产物浓度 P 及底物浓度 S ; 横坐标是发酵时间 t 。在时间 $t = t_1$ 时的比生长速率, 产物形成比速率和底物消耗比速率都明确地表示在图 3-10 上。由图 3-10 可知, 各比速率是分批发酵过程时间 t 的函数, 与对数生长期相一致, 即:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{d \ln X}{dt} \quad (3-27)$$

(四) 反应进程动力学

亭道孚 (Deinderfer) 根据反应形式提出五种发酵动力学类型。

1. 简单反应型 营养成分以固定的化学量转化为产物, 没有中间物积聚。又可分为有生长偶联和无生长偶联两类。

2. 并行反应型 营养成分以不定的化学量转化为产物, 在反应过程中产生一种以上的产物, 而且这些产物的生成速率随营养成分的浓度而异, 同时没有中间物积聚。

3. 联反应型 是指在形成产物之前积累一定程度的中间物的反应。

4. 分段反应型 其营养成分在转化为产物之前全部转变为中间物, 或营养成分以优先顺序选择性地转化为产物。反应过程是由两个简单反应段组成, 这两段反应由酶诱导调节。

5. 复合型 大多数发酵过程是一个联合反应, 它们的联合可能相当复杂。

(五) 分批培养过程的生产率

在评价发酵过程的成本、效率时, 应利用生产率这个概念。它可以定义为:

$$\text{生产率 (P)} = \frac{\text{产物浓度 (g/L)}}{\text{发酵时间 (h)}} \quad (\text{g/h} \cdot \text{L}) \quad (3-28)$$

生产率是个综合指标, 在讨论分批培养过程时, 必须考虑所有的因素。在计算时间时, 不仅包括发酵时间, 还包括放罐、清洗、装料和消毒时间以及延滞期所耗的时间。图 3-11 表示整个过程中所经历的时间的典型分析, 并显示了平均生产率和最大生产率。

发酵总时间为:

$$t = \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \frac{X_t}{X_0} + t_c + t_f + t_1 \quad (3-29)$$

式中: t_c ——放罐清洗时间;

t_f ——装料消毒时间;

t_1 ——迟滞时间;

X_0 、 X_f ——分别为细胞的最初和

最终浓度。

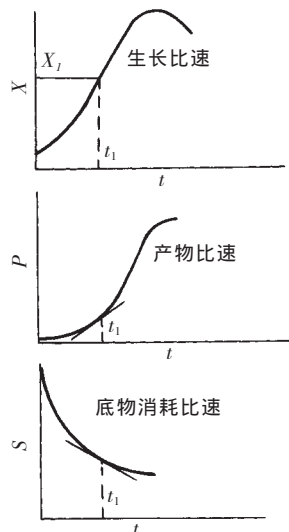


图 3-10 生长比速率、产物形成比速率及底物消耗比速率的定义

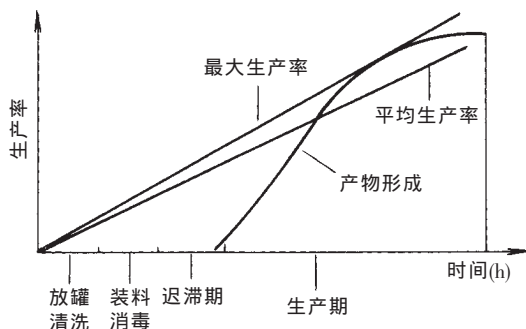


图 3-11 分批培养的生产率

如令 $t_L = t_c + t_f + t_1$ ，平均生产率可表示为：

$$P = \frac{X_t - X_0}{\frac{1}{\mu_{\max} \ln \frac{X_f}{X_0}} + t_L} \quad (3-30)$$

通过方程可以估算发酵过程中各种因素的变化对平均生产率的影响。接种量大， X_0 就大，发酵过程缩短，减少 t_c 和 t_f ，也能缩短周期。对于短周期发酵（18~70h）而言， t_c 和 t_f 非常重要，而对于长周期发酵（3d以上）， t_c 和 t_f 就不太重要。迄今为止，分批培养是最常用的培养方法，广泛应用于各种发酵过程。

三、补料分批发酵动力学

补料分批发酵又称半连续发酵或半连续培养，是在分批培养过程中，间歇或连续的补加新鲜培养基的培养方法。与传统的分批发酵相比，其优点在于使发酵系统中维持很低的基质浓度。低基质浓度的优点为：①可以除去快速利用碳源的阻遏效应，并维持适当的菌体浓度，使不至于加剧供养的矛盾。②避免培养基积累有毒代谢产物。补料分批发酵广泛应用于抗生素、氨基酸、酶制剂、核苷酸、有机酸等的生产。

（一）分批补料发酵动力学

设系统内的培养液体积 V ，微生物浓度 X 以及营养物浓度 S 等均随时间变化，稀释率 D 也将按下式减少。

$$D = \frac{F}{V_0 + Ft} \quad (3-31)$$

式中： V_0 ——原有发酵液体积；

F ——营养物补入速率；

t ——补料时间。

所以，分批补料操作是一个不稳定的过程。分批补料操作的另一个特点是：营养物的补入速率不一定是恒速。分批补料操作的优点是能够人为地控制流加底物在培养液中的浓度。分批操作中一次加入的底物在分批补料操作中逐渐流加，因而可根据流加底物的流量及其被微生物的利用率来确定流加量。

（二）分批补料发酵动力学计算

前已述及，分批补料操作是一种不稳定过程，它的 V 、 X 、 S 等均随时间变化，如果建立物料衡算式，对微生物

$$\frac{d(V_X)}{dt} = FX_0 + r_X V \quad (3-32)$$

对营养物

$$\frac{d(V_S)}{dt} = FS_0 - r_S V \quad (3-33)$$

式中： $r_X = \mu X$ 及 $r_S = \frac{r_X}{Y_{X/S}}$ 。

对总物料

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (3-34)$$

这里的 F ，可以是时间的函数 $F(t)$ ，已如前述。

在 $X_0=0$ 的情况下，式 (3-32) 可写成

$$\frac{d(VX)}{dt} = \left[\frac{dV}{dt}X + \frac{dX}{dt}V \right] = \mu_X V \quad (3-35)$$

合并式 (3-34) 和式 (3-35)，可得

$$\frac{dX}{dt} = -\frac{F}{V}X + \frac{\mu_{\max}S}{k_S + S}X \quad (3-36)$$

同样，营养物质的衡算式可简化为

$$\frac{dS}{dt} = (S_0 - S)\frac{F}{V} - \frac{\mu_{\max}S}{k_S + S} \cdot \frac{X}{Y_{X/S}} \quad (3-37)$$

式 (3-34)、式 (3-36) 和式 (3-37) 均是分批补料操作时的数学模型，如果操作条件下及各种动力学参数给定，经解上述微分方程后，即可获得罐内 X 、 S 、 V 、 D 等随时间 t 的变化规律。

(三) 分批补料培养的优点及应用

分批补料培养介于分批培养和连续培养之间，兼有两者之优点，而且克服了两者的缺点。同传统的分批培养相比，补料培养的优越性是明显的，首先它可以解除底物的抑制、产物的反馈抑制和葡萄糖分解阻遏效应。对于好氧发酵，分批补料培养可以避免在分批发酵中因一次性投料过多造成细胞大量生长，耗氧过多，以至通气搅拌设备不能匹配的状况，还可以在某些情况下减少菌体生成量，提高有用产物的转化率。在补料分批培养中，菌体可被控制在一系列连续的过渡阶段，可用来作为控制细胞质量的手段和理论的研究。与连续培养相比，分批补料培养不需要十分严格的无菌条件，也不会产生菌体的老化和变异问题，其使用范围也比连续培养要广。虽然该技术在理论上的研究比连续培养迟了近 20 年，但目前对它的研究越来越活跃。迄今为止，运用分批补料培养技术进行生产和研究的范围十分广泛，包括单细胞蛋白、氨基酸、生长激素、抗生素、维生素、酶制剂、有机溶剂、有机酸、核苷酸、高聚物等，几乎遍及整个发酵行业。另外，分批补料培养技术不仅广泛用于液体发酵中，而且曾有人在固体发酵中也采用该技术，在混合培养中的应用也有过报道。可以预期，随着研究工作的深入和计算机在发酵过程自动控制中应用的发展，分批补料培养必将在发酵工业中得到更为广泛的应用，发挥更大的经济效益。

四、连续发酵动力学

连续发酵是指以一定速度连续不断向培养系统中流加新鲜培养基，同时又以同样的速度连续不断地将发酵液排出，使发酵罐中微生物的生长和代谢活动始终保持旺盛的稳定状态。培养过程中，微生物细胞所处的环境条件，如 pH、温度、营养成分的浓度、溶解氧、比生长速率可以自始至终基本保持不变，并还可从系统外部予以调整，使菌体维持在恒定生长速度下进行连续生产。

和发酵。连续发酵大大提高了发酵的生产效率和设备利用率，达到稳定、高速培养微生物细胞或产生大量代谢产物的目的。

连续发酵包括恒化器 (chemostat) 发酵和恒浊器 (turbidostat) 发酵。前者以某种必需营养物质作为生长限制基质，通过控制其流加速率造成适应这种流加条件的生长密度和生长速率。后者是使培养液中细胞浓度维持恒定。两种方法的基本要求是保持恒定的发酵液体积。它们互为补充，并可用相似的动力学方程式进行描述。无论恒化器还是恒浊器，除了控制进出口物料流量外，许多重要的环境因素如温度、pH、空气流量、压力等也必须加以控制，以保持稳定。同时，还应当有良好的搅拌混合条件，使整个发酵液中所有物质的分布都达到均一，以保证流出物中各物质的浓度与反应器中的浓度相同。

连续发酵为研究微生物对周围环境的影响，以及在最优条件下研究细胞和产物的生产，开辟了一条独特的途径。

(一) 简单连续培养动力学

现在，以最常用的完全混合型单级恒化器的连续培养为例，介绍恒定状态理论及其特性，其基本原理和方法同样适用于恒浊器系统。

1. 微生物的物料衡算 为了描述恒定状态下恒化器的特性，必须求出细胞和限制性营养物质浓度与培养基流速之间关系的方程。利用物料平衡，很容易建立有关的方程。对微生物细胞的衡算，可按下进行：

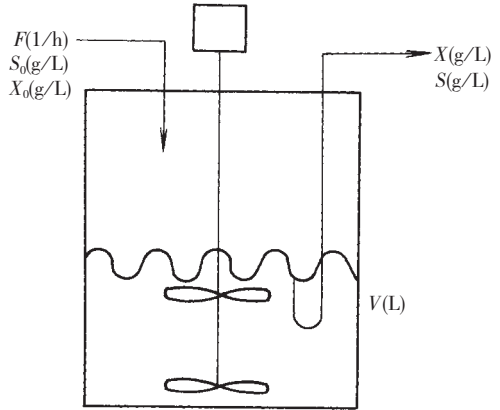


图 3-12 典型的单级恒化器示意图

(细胞进入) - (细胞流出) + (细胞生长) - (细胞死亡) = (细胞积累速率)

$$\frac{dX}{dt} = \frac{FX_0}{V} - \frac{F}{V}X + \mu X - \alpha X \quad (3-38)$$

式中： F ——培养液体积流量 (m^3/min 、 L/h)；

V ——发酵器有效体积 (m^3 、 L)；

X_0 ——进料中的微生物细胞浓度 (个/L、 g/L)；

μ ——微生物的比生长速率 ($1/\text{h}$)；

α ——微生物的比死亡速率 ($1/\text{h}$)；

t ——时间 (h)。

如果忽略细胞的死亡，并假定进料液体均是灭过菌的营养物， $X_0 = 0$ ，且 $D = \frac{F}{V}$ 则上式可简化为：

$$X(\mu - D) = \frac{dX}{dt} \quad (3-39)$$

$$\frac{1}{D} = \frac{V}{F}$$

式中 D 称为稀释率，是连续培养系统中的一个重要参数，它的倒数，即物料在器内的平均停留

时间 T 。通过对上式分析,可揭示连续培养时,微生物的比生长速率 μ 受控于稀释率 D 的特性。

如果是稳定操作:

于是

$$X(\mu - D) = 0$$

因为 $X \neq 0$, 故有

$$\mu = D \quad (3-40)$$

这表明,在连续培养时,微生物的比生长速率取决于稀释率;也就是说,稀释率改变(流量改变),微生物的比生长速率也将随之改变,最终在新的情况下 $D = \mu$ 。根据这一特点,在一定的范围内,人为地调节培养基的流加速度,可以使细胞按所希望的比生长速率来生长,并可考察、研究微生物的生长特性。

2. 限制性营养物的物料衡算 为了进一步关联微生物细胞浓度 X , 营养物浓度 S 与稀释率 D 之间的关系,需再建立营养物的物料衡算。对发酵罐而言,营养物的物料平衡可以表示为:

(进入) - (流出) - (菌体合成) - (维持生命需要) - (形成产物消耗) = (营养物积累速率)

但在一般情况下,维持生命需要和形成产物消耗的营养物的量远小于生长消耗的营养物的量,故可忽略不计。从而得:

$$\frac{F}{V}S_0 - \frac{F}{V}S - \frac{\mu X}{Y_{X/S}} = \frac{dS}{dt} \quad (3-41)$$

或

$$D(S_0 - S) - \frac{\mu X}{Y_{X/S}} = \frac{dS}{dt}$$

式中: F ——培养液体积流量 (m^3/min 、 L/h);

V ——发酵器有效体积 (m^3 、 L);

S_0 、 S ——进料和出料中的营养物浓度 (g/L);

$Y_{X/S}$ ——营养物的收率系数,表明营养物转化为细胞的程度 (g 细胞 / g 营养物) 或 (g 细胞 / g 营养物)。若为稳定操作,有

$$\frac{dS}{dt} = 0$$

则式 (3-41) 可简化为

$$D(S_0 - S) = \mu X / Y_{X/S} \quad (3-42)$$

因稳定操作时 $\mu = D$, 故又得:

$$X = Y(S_0 - S) \quad (3-43)$$

(二) 连续发酵法的优缺点

连续发酵和分批发酵比较,具有以下一些优点:①可以维持稳定的操作条件,从而使产率和产品质量也相应保持稳定;②能够更有效地实现机械化和自动化,降低劳动强度;③减少设备清洗、准备和灭菌等非生产占用时间,提高设备利用率,节省劳动力和工时;④由于灭菌次数减少,使测量仪器探头的寿命得以延长;⑤容易对过程进行优化,有效地提高发酵产率。

连续发酵的缺点为:①对设备、仪器及控制元件的技术要求较高,从而增加投资成本;②由

于是开放系统，加上发酵周期长，容易造成杂菌污染；③在长周期连续发酵中，微生物容易发生变异，生长慢的高产菌株很可能逐渐被生产快的低产变异株取代，从而使产率下降；④黏性丝状菌菌体容易附着在容器壁上生长及在发酵液中结团，给连续发酵操作带来困难。

第七节 细胞生物反应器

细胞生物反应器又称发酵罐，它是为微生物细胞生长和形成代谢产物提供适宜的物理及化学环境，使细胞生长得更好更快，得到更多需要的代谢产物。细胞生物反应器在发酵过程中占据中心地位，是生物技术产品产业化的关键设备。抗生素工业的兴起引起发酵工业的一场变革，标志着工业发酵进入一个新阶段。新的发酵产品不断涌现，对发酵设备的要求越来越高，一些交叉学科逐渐形成，如化学工程和生物学交叉形成了生化工程学科，生物学、化学和工程学交叉形成了生物技术学科，它们对发酵设备的放大、发酵罐的研制及发酵过程的控制起着非常大的推动作用。

20世纪初出现了 200m^3 的钢质发酵罐，在面包酵母发酵中开始使用空气分布器和机械搅拌装置；第一个大规模工业生产青霉素的工厂于1944年投产，其发酵罐的体积是 54m^3 。机械搅拌、通气、无菌操作、纯种培养等一系列技术开始完善起来，并出现耐高温在线连续测定的pH电极和溶氧电极，开始利用计算机进行发酵过程控制。1960—1979年，机械搅拌通气发酵罐的容积增大到 $80\sim 150\text{m}^3$ 。由于大规模生产单细胞蛋白的需要而出现了压力循环和压力喷射型发酵罐，计算机开始在发酵工业上得到广泛应用。1979年以后，随着生物工程和技术的迅猛发展，大规模细胞培养发酵罐应运而生，胰岛素、干扰素等基因工程的产品走上商品化。对发酵罐的严密性、运行可靠性的要求越来越高，发酵的计算机控制和自动化的实际运用已相当普遍。pH电极、溶氧电极、溶解 CO_2 电极等在线检测在国外已相当成熟。同时现代发酵工业为了获取更大的经济利益，发酵罐更加趋于大型化：废水处理 $2\,700\text{m}^3$ ，单细胞蛋白 $1\,500\text{m}^3$ ，啤酒 600m^3 ，柠檬酸 200m^3 。

常用的发酵设备一般分为液体和固体两种发酵设备。

一、液体发酵罐

液体发酵罐是工业发酵中最重要、应用最广泛的设备，从废水处理、单细胞蛋白生产，到啤酒、酒精、有机酸、酶制剂、氨基酸、抗生素等的发酵大都采用液体发酵方法。液态培养基的流动性大，对工艺条件（如温度、溶氧、pH、营养成分等）的控制就较容易，有利于自动控制。同时，由于在密闭的发酵罐内纯种发酵，产品纯度较高，质量也较稳定。另外，还具有机械化程度高、劳动强度小、设备利用率高等优点。

发酵工业上最常用的还是通气搅拌罐，压力循环发酵罐，一些新型反应器（如带超滤膜的发酵罐）等也在不断涌现。

（一）发酵罐的类型

各种不同类型的发酵罐都可用于大规模的生化反应过程，它们在设计、制造和操作方面的要

求, 取决于某一产品的生物化学反应过程对发酵罐的要求。发酵罐的分类有以下几种。

1. 按微生物生长代谢需要分类 这种方法将发酵罐分成好氧和厌氧两大类。酶制剂、酵母、氨基酸、醋、红曲色素、类胡萝卜素、抗生素、维生素等产品是在好氧发酵罐中进行的, 酒精、啤酒、乳酸、丙酮、丁醇采用厌氧发酵罐。它们的主要差别是由于对无菌空气的需求不同, 前者需要强烈的通气搅拌, 目的是提高氧在发酵液中的体积氧传递系数 k_{La} , 增加溶解氧, 后者则不需要通气。

2. 按照发酵罐设备特点分类 可以分为机械搅拌通气发酵罐和非机械搅拌通气发酵罐。前者包括循环式(如伍式发酵罐、文氏管发酵罐)以及非循环式的通气式发酵罐和自吸式发酵罐等。后者包括循环式的气提式、液提式发酵罐以及非循环式的排管式和喷射式发酵罐。这两类发酵罐采用不同的手段使发酵罐内的气、固、液三相充分混合, 从而满足微生物生长和产物形成对氧的需求。

3. 按容积分类 一般认为500L 以下的是实验室发酵罐, 500~5 000L 是中试发酵罐, 5 000L 以上是生产规模的发酵罐。

4. 按微生物生长环境分类 发酵罐内存在两种系统, 即悬浮生长系统和支持生长系统。一般说来, 大多数发酵罐都有这两种系统。悬浮生长系统中, 微生物细胞浸泡在培养液中且伴随着培养液一起流动。在支持生长系统中, 微生物细胞生长在与培养液接触的界面上, 形成一层薄膜。然而, 悬浮生长系统的容器内壁上和上部的罐壁上也会生长着一层菌体膜, 在支持生长系统中也有菌体分散在培养液之中。

5. 按操作方式分类 可分为分批发酵和连续发酵, 但并不是所有的发酵罐可以同时适用于这两种发酵系统。分批发酵时, 发酵工艺条件随营养液的消耗和产物的形成而变化。每批发酵结束, 要放罐清洗和重新灭菌, 再开始新一轮的发酵。分批发酵系统是非稳定态的过程。连续发酵时, 新鲜营养液连续流加入发酵罐内, 同时产物连续地流出发酵罐。

分批发酵的主要优点是污染杂菌的比例小, 操作灵活性强, 可用来进行几种不同产品的生产。其缺点是发酵罐的非生产停留时间所占比重较大, 非稳态工艺过程的设计和操作困难。

连续发酵的主要优点是可连续运行几个月的时间, 非生产时间很短; 缺点是容易染菌, 它适用于不易染菌的产品如酒精、啤酒、丙酮、丁醇发酵等, 连续发酵还有以下一些优点: ①较高的底物转化系数; ②具有较高的反应体积速率, 这是由于它允许在发酵初期有较高的底物浓度, 因此最终底物浓度也高; ③不同级数的发酵罐的条件可以不同(如 pH、温度、通气量等), 特别是底物浓度和加料速度可以变化, 以获得较高的经济利益。

6. 其他类型 新型的超滤发酵罐已开始在工业发酵中崭露头角。在运行时, 成熟的发酵液通过一个超滤膜使产物能透过膜进行提取, 酶可以通过管道返回发酵罐继续发酵, 新鲜的底物可源源不断地加入罐内。

(二) 密闭厌氧发酵罐

密闭不通气分批发酵罐多用于厌氧性发酵, 如酒精、啤酒、丙酮、丁醇、1, 3-丙二醇等。对这类发酵罐的要求是: 能封闭; 能承受一定压力; 有冷却设备; 罐内尽量减少装置, 消灭死角, 便于清洗灭菌。

1. 酒精发酵罐 罐顶有 CO_2 出口, 罐圆柱体直径与高比为 1:2~2.5。发酵罐总容积为:

$$V = \frac{V_0}{\phi} \quad (3-44)$$

式中： V_0 ——进入发酵罐的发酵液量 (m^3)；

V ——发酵罐总容积 (m^3)；

ϕ ——装液系数 (一般取 $\phi=0.85\sim 0.90$)。

发酵罐冷却装置, 中小型罐采用表面冷却, 大罐为表面和罐内双重冷却。冷却面积计算方法如下式:

$$S = \frac{Q}{k\Delta t_m} \quad (3-45)$$

式中： Q ——总发酵热 (J/h)；

k ——传热总系数 [$J/(m^2 \cdot h \cdot ^\circ C)$]；

Δt_m ——对数平均温度差 ($^\circ C$)；

S ——冷却面积 (m^2)。

2. 丙酮-丁醇发酵罐 生产丙酮-丁醇的发酵罐比酒精发酵罐高, 罐身需要耐高压, 罐壁较厚, 用钢板制成。顶盖和底部采用球形封头, 罐内表面平整、光滑, 采用表面喷淋冷却。种子罐采用夹套冷却。

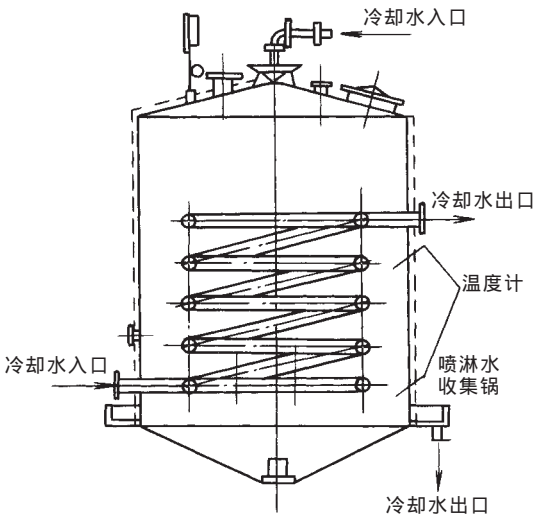


图 3-13 酒精发酵罐

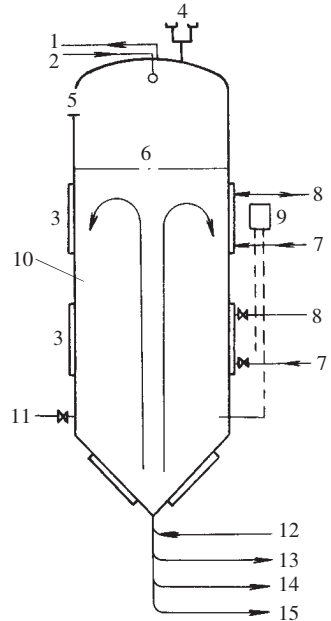


图 3-14 啤酒发酵罐

1. CO₂排出 2. 洗涤管 3. 冷却夹套 4. 加压装置 5. 人孔 6. 发酵液面 7. 冷冻剂进口
8. 冷冻剂出口 9. 温度控制器 10. 温度计
11. 取样口 12. 麦汁管 13. 嫩啤酒管路
14. 酵母排出 15. 洗涤剂管路

3. 啤酒发酵设备 传统的啤酒发酵工艺分为主发酵和后发酵, 设备由分别设在发酵室的主发酵池和贮酒罐两部分组成。贮酒罐为金属的圆筒形密闭容器, 有卧式和立式两种, 大多数工厂

采用卧式，在室内或室外呈品字形排列，中间用钢枕架开。圆柱锥底形密闭式发酵罐可主后酵共用，主发酵后酵母凝集沉淀于锥底，回收方便。罐本身具有冷却夹套或盘管，圆柱部分视罐高度可分为2~3段冷却，锥底部分设有一段冷却，冷却剂采用35%丙二醇或酒精溶液及液氮。罐外包绝热层，一般用聚苯乙烯或聚氨酯泡沫塑料等，厚约20cm。罐放置于露天，锥形罐为密闭，可以进行CO₂洗涤，也可以回收CO₂，既可作发酵罐，又可作贮酒罐。罐的锥体高度为总高度的1/3~1/4，锥形角度一般为70°~75°，一般径高比为2:6，径高比越接近于1，充满系数就越低。罐越高对流越旺盛。发酵罐容量为60~600m³不等。工作压力0.07MPa。罐内，壁要求平整、光滑，罐顶装有真空限制阀、安全阀、压力传感元件、人孔等。锥底有冷却夹套和啤酒进出管道、阀门与视镜、取样管阀、测温测压的传感元件或温度计和CO₂洗涤装置等。

(三) 通气式发酵罐

1. 机械搅拌通用式发酵罐 机械搅拌通用式发酵罐是最广泛应用的深层好氧培养设备，是好氧生物反应器的典型代表。其主要部分有壳体、控温部分、搅拌部分、通气部分、进出料口、测量系统和附属系统等。设备结构如图3-15和图3-16所示。

图3-17是常用的发酵罐各部分的比例尺寸，它常用于面包酵母、酶制剂、抗生素及氨基酸的生产中，有关的重要因素是氧传递效率、功率输入、混合质量、搅拌浆形式和发酵罐的几何比例等。

发酵罐最重要的几何比例是 D_i/D_t 、 H/D_t 、 D_S/D_i 、 D_b/D_t (D_i 为搅拌桨直径， D_t 为罐体直径， H 为罐体高度， D_S 为搅拌桨到罐底的距离， D_b 为挡板的宽度)；还有搅拌桨的叶轮直径

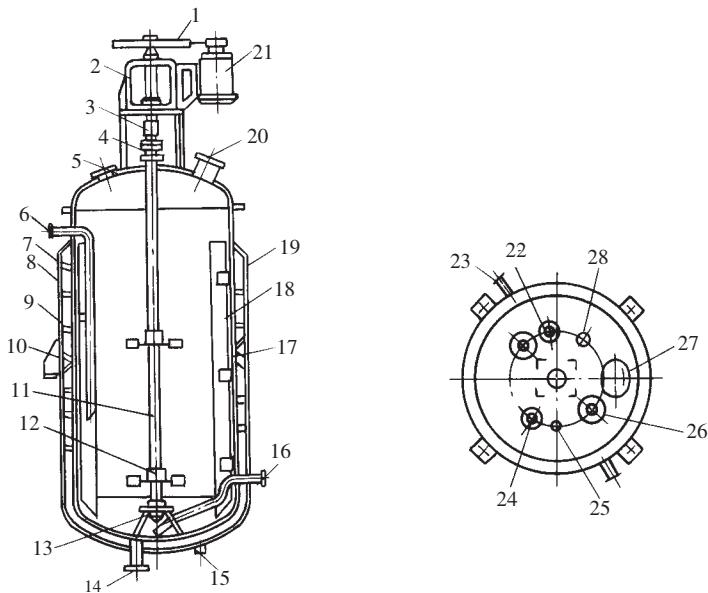


图 3-15 小型发酵罐结构

1. 三角皮带转轴 2. 轴承支柱 3. 联轴节 4. 轴封 5. 窥视镜 6. 取样口 7. 冷却水出口
8. 夹套 9. 螺旋片 10. 温度计 11. 轴 12. 搅拌器 13. 底轴承 14. 放料口 15. 冷却水进口 16. 通气管 17. 热电偶接口 18. 挡板 19. 接压力表 20. 手孔 21. 电动机
22. 排气口 23. 取样口 24. 进料口 25. 压力表接口 26. 窥视镜 27. 手孔 28. 补料口

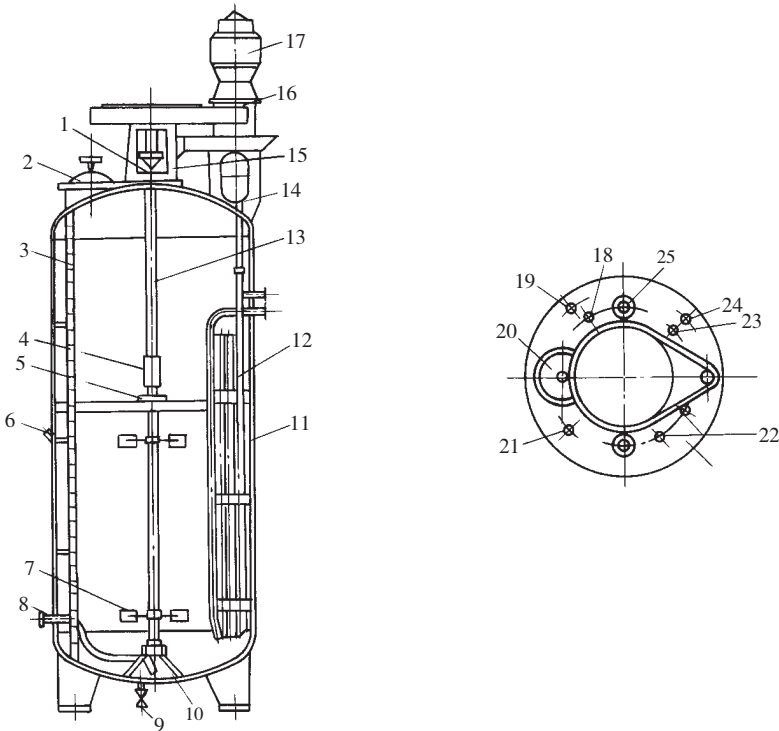


图 3-16 大型发酵罐结构

1. 轴封 2. 人孔 3. 梯子 4. 联轴节 5. 中间轴承 6. 热电偶接口 7. 搅拌器 8. 通气管
9. 放料口 10. 底轴承 11. 温度计 12. 冷却管 13. 轴 14. 取样 15. 轴承柱 16. 三角皮
带传动轴 17. 电动机 18. 压力表 19. 取样口 20. 人孔 21. 进料口 22. 补料口 23. 排
气口 24. 回流口 25. 窥镜

和各部分的比例。通用发酵罐的搅拌桨最广泛使用的是平叶涡轮搅拌桨，国内采用的的大多数是六平叶式，其各部分尺寸比例已规范化。这种搅拌桨具有很大的循环液输体送量，功率消耗大，因此特别适用于丝状菌的发酵，如青霉素发酵等，其最大叶端速度范围是 $3\sim 8\text{m/s}$ 。

通用发酵罐的搅拌装置包括电动机、传动装置、搅拌轴、轴密封装置和搅拌桨。机械搅拌的目的是迅速分散气泡和混合加入物料。一个搅拌桨要同时达到这两个目的，有时是矛盾的。例如，达到混合功能需要大直径的搅拌器和采用低转速运转，而提高分散气泡效果则需要多叶片、小直径和大的转速。电动机输入功率决定于搅拌桨的形式和其他发酵罐部件。发酵罐内常安装四块挡板以增加混合、传热和传质效率。挡板之宽度为发酵罐直径的 $10\%\sim 12\%$ ，挡板越宽混合效果越好。搅拌功率的计算一直作为发酵罐设计和放大中的一个重要课题，它是指搅拌桨输入发酵液

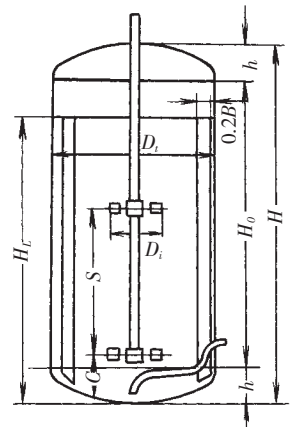


图 3-17 通用发酵罐的比例尺寸

$$D_i = 1/3 D \quad H_0 = 2D \quad B = 0.1D_i$$

$$S = 3D_i \quad C = D_i$$

的功率，即搅拌浆在转动时为克服发酵液阻力所作的功率，有时被称作轴功率。

通气条件下非牛顿流体搅拌功率的计算常用 Michel-Miller 公式：

$$P_g = Q_1 \left[\frac{P_0^2 N D_i^3}{Q^{0.56}} \right] Q_2 \quad (3-46)$$

式中： Q_1 、 Q_2 ——与流体黏度有关的系数；

P_g ——通气功率 (kW)；

P_0 ——不通气功率 (kW)；

N ——搅拌转速 (r/min)；

D_i ——搅拌器直径 (m)；

Q ——通气量 (L/min)。

在好氧深层发酵罐中，来自无菌空气系统的压缩空气通过空气分布器射入发酵罐内，分布器有单孔式和多孔管式。安装方式各异，一般安装在最下面一档搅拌器的下方，但都要注意防止气孔被发酵液中的菌体或固体颗粒堵塞。有的空气分布器带有放水结构，使放罐后没有发酵液残留在管子里。

通气速率以满足微生物发酵的需要为准，要使溶解氧在临界氧浓度之上。通气率决定于系统的设计和操作系统。空气流速的上限速度是空气能被有效地被搅拌浆分散，这和搅拌浆形式和转速有关。

表示非牛顿流体的氧传递的关系式如下。 k_{LA} 是表示发酵罐通气搅拌效率的体积氧传递系数。

$$k_{LA} = k[(P/V)^a \cdot (V_S)^\beta \cdot (\eta_{app})^{-\omega}] \quad (3-47)$$

式中： k ——经验常数，随搅拌器的形式而改变，一般由实验测定；

P/V ——单位体积发酵液实际消耗的功率（在通气情况下）；

V_S ——空气直线速度 (m/h)；

η_{app} ——发酵液表观黏度 ($\text{kg} \cdot \text{s} / \text{m}^2$)；

α 、 β 、 ω ——指数，与搅拌器和空气分布器的形式有关，一般由实验测定。

2. 改良通用式发酵罐 几种改良通用式发酵罐是：

(1) 瓦尔德霍夫发酵罐。它装有一种独特的消泡装置。

(2) 一种带有上下两个分离搅拌器的发酵罐。上搅拌采用螺旋桨，用以加强轴向流动；下搅拌采用涡轮桨分散气体，可以提高氧传递效率。这种设计方法充分发挥了这两种搅拌浆各自的特长。

(3) 完全填充反应器是一种比通气搅拌罐能更有效地提高氧传递效率的发酵罐。它混合时间短，即使对十分黏稠的液体也有同样效果。它还消除了罐顶的空间，空气在罐内的滞留时间比通气搅拌罐长。

改良型通用式发酵罐虽然有一些改进，但是它的实际应用却远没有通用发酵广泛。

3. 自吸式发酵罐 自吸式发酵罐如图 3-18 所示，它与通用发酵罐的主要区别是：①有一个特殊的搅拌器，搅拌器由转子和定子组成；②没有通气管。

自吸式发酵罐的搅拌器有几种：①回转翼片式自吸搅拌器；②喷射式自吸搅拌器；③具有转子和定子的自吸搅拌器。第①和③种结构简单，使用较多，它的传动装置可安装在罐底和罐

顶。第②种耗电省，但由于喷射泵构造复杂，工作时以泵的背侧排除发酵液中的空气，制造要求高，难度大。

具有转子和定子的搅拌器的吸气原理是：浸在发酵液中的转子迅速旋转，液体和空气在离心力的作用下，被甩向叶轮外缘。这时，转子中心处形成负压，转子转速愈大，所造成的负压也愈大。由于转子的空腔与大气相通，发酵罐外的空气通过过滤器不断地被吸入，随即甩向叶轮外缘，再通过异向叶轮使气液均匀分布甩出。转子的搅拌，又使气液在叶轮周围形成强烈的混合流。空气泡被粉碎，气液充分混合。

我国自 20 世纪 60 年代开始研制自吸式发酵罐，已应用到醋酸、酵母、蛋白酶、维生素 C 和利福霉素等发酵产品上。当用图 3-18 所示自吸式发酵罐生产醋时，转化率可达到 97%。日本一家工厂用它生产 1 吨醋酸发酵液耗电量为 $1\text{kW}\cdot\text{h}$ 。

(四) 液提式发酵罐

由于某一发酵产品的固定成本和可变成本是随工厂生产规模的增大而减少的，因此现代发酵罐的大型化给通气搅拌罐带来一系列难以克服的困难，这就是：大于 1000kW 的机械搅拌；大量的冷却水和排除热量；能量的均匀分布；溶解氧、碳源和其他营养与 pH 控制等。由于这些困难的出现，以后就发展起在经济上、工艺上、生物因素等方面比机械搅拌罐更先进的新型生化反应器，以适应各种类型的发酵。例如英国的 ICI 公司采用“压力循环发酵罐”生产单细胞蛋白，容积达 2600m^3 ，工作容积为 2100m^3 ；在 Leverkusen Bayer AG 建造的总容积为 2000m^3 污水处理工厂，发酵罐高 30m，直径 26m。

液提发酵罐是液体借助于一个液体泵进行输送，同时气体在液体的喷嘴处被吸入发酵罐。液提发酵罐的常见形式有：① 喷嘴塔式；② 喷嘴塔循环式；③ 喷嘴循环式；④ 喷射通道式；⑤ 滴流式；⑥ 六级塔循环式；⑦ 管道循环式；⑧ 下流塔式；⑨ 液体流化床式。

(五) 气提式发酵罐

气提式主要包括内环式和外环式反应器，如图 3-19 所示。

气提式环流反应器不设置机械搅拌装置，利用通入培养液的气泡上升时带动液体运动，产生混合效果，能耗低，液体中的剪切作用小，结构简单，且由于省去了机械搅拌而不需机械密封，避免了因机械密封不良造成的污染。但它不适用于高黏度或含大量固体的培养液。

为了进一步使环流管内的气泡被破碎分散，增加氧的传递，近年来在环流管内安装静态混合元件，取得了较好效果。

(六) 膜生物反应器

膜生物反应器是用于生化过程的膜反应器，它是将细胞或微生物等截留或存放在海绵体内，

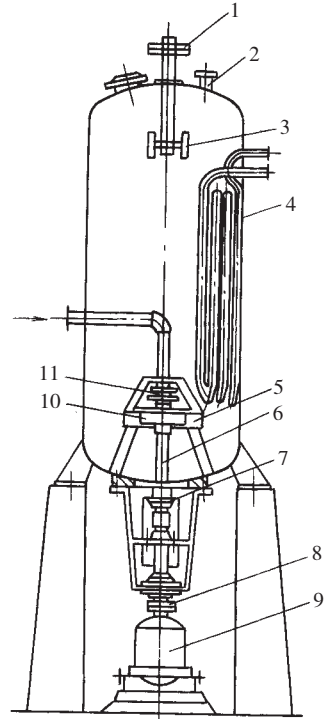


图 3-18 自吸式发酵罐
1. 皮带轮 2. 排气管 3. 消泡器 4. 冷却排管 5. 定子 6. 轴 7. 双端面轴封
8. 联轴节 9. 马达 10. 转子
11. 端面轴封

以实现生物催化剂和反应溶液的即时分离。膜生物反应器可用于微生物发酵和动植物细胞的培养，对解决产物抑制、底物的选择供给、生物催化剂的重复使用，提高细胞的生长表面和高密度负载等都很有利。况且生化条件温和，高分子膜也可适用，到目前为止已研究过几百个体系，认为膜生物反应器将是最有发展前途的一种生物反应器。

1. 膜生物反应器的类型 在膜生物反应器中，细胞或微生物等存在以下几种形态：悬浮细胞属游离态；膜表面或膜内凝胶和膜截留细胞层为凝集态；以吸附或包埋方式存在于膜表面呈固定化形态。固定化形态的细胞难以从膜生物反应器中清除，不便于补充和置换，但用于生物催化具有较高的稳定性。凝集态生物催化剂的装填密度最高，活力稳定性高于游离态，但细胞的消除存在一定困难。

2. 用于生物反应器中的膜生物反应器 在发酵过程中，普遍存在着代谢产物抑制微生物生长的现象。利用膜实现微生物细胞的固定化和产物的及时分离是促进细胞高密度生长，增加代谢产物的产率，实现连续发酵的有效措施。用于发酵过程的膜生物反应器可分为两类，一是中空纤维固定化细胞反应器，另一类是发酵罐与膜分离组件相结合的细胞循环膜发酵系统，见图 3-20。

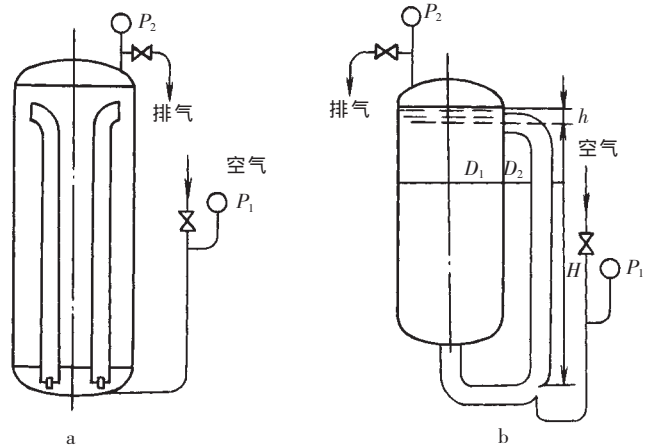


图 3-19 气提式发酵罐
a. 内循环带升式发酵罐 b. 外循环带升式发酵罐

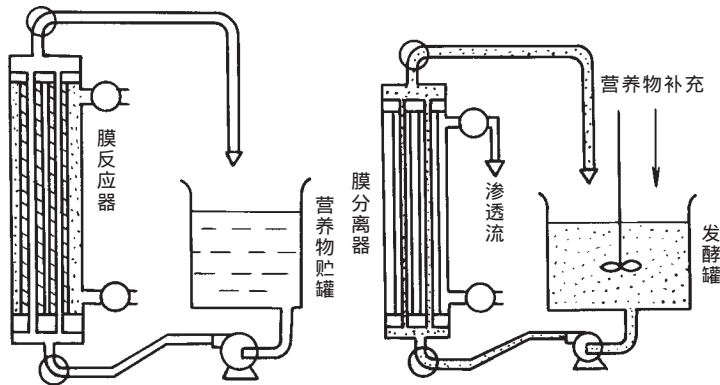


图 3-20 细胞膜循环发酵系统

前者将微生物固定在中空纤维组件的壳程或膜的支撑层内，营养物质则从膜管内流过。Vickroy 将其用于发酵法生产乳酸，细胞密度高达 480DW/L，乳酸体积产率是间歇发酵的 20 倍，但中空纤维却因细胞高密度生长而破裂。Michaels 在中空纤维反应器内固定大肠杆菌，细胞生长密

度达到 10^{12} 个 μmL 。在细胞循环膜发酵系统生产酒精、乳酸、丙酮、丁醇都取得了一定的成功。表 3-16 比较了不同反应技术用于啤酒酵母生产酒精的实验结果。从表 3-16 可以看出，反应器产率的提高同时导致产物浓度的降低。为提高产品浓度，渗透汽化膜的应用是发展方向。

表 3-16 从葡萄糖生产酒精的各种生物反应器的比较

反应器		糖浓度 g/L	酒精浓度 g/L	转化率 %	体积产率 $\text{g/L}\cdot\text{h}$
间歇发酵罐		100	49	99	2~3
		200	98	99	4~5
中空纤维固定化发酵系统		89	12	27	26
		100	40	85	10
		100	49	99	100
细胞循环膜发酵系统	超滤组件	200	65	65	130
		140	65	99	85
		95	90	94	32
	渗透汽化组件	200	35/12	—	6.3

膜发酵系统的研究已取得了重大的进展，但还存在着膜的污染和破裂，以及 CO_2 的积累等问题。无机膜反应器的应用是另一大发展方向。

(七) 基因工程菌生物反应器

基因工程菌是通过基因操作得到的 DNA 重组微生物，为了不使基因工程菌在培养或处理过程中泄露到周围环境而造成意想不到的危害，用于基因工程菌的生物反应器同一般的生物反应器就有相当大的不同。造成生物反应器内微生物泄露的一大原因是排气，基因工程菌反应器的排气必须经加热灭菌或经微孔过滤器除菌后才能排放到大气中。轴封渗漏是造成菌体泄露的另一个原因，可采用双端面密封，且作为润滑剂的无菌水压力应高于反应器内压力。

二、固体发酵设备

固体发酵设备可按照培养方式来分为四种形式：浅盘式、旋转式、传送带式和箱式。

(一) 浅盘式固体发酵设备

浅盘式固体发酵是使用最早的一种固体培养方式。采用曲盘、帘子装入固体培养基，厚约 2~5cm，在能够控制温湿度的曲房内的盘架上进行发酵（图 3-21）。工业上用多层铝制浅盘放在架子上进行培养，培养室保持一定的温度和湿度。该法曲室占用面积大，曲盘数量多，全部依靠

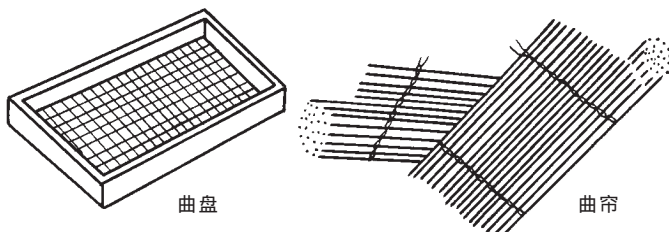


图 3-21 固态发酵的曲盘和帘子

手工操作，劳动强度大，卫生条件差，曲盘的清洗灭菌和维修等耗用蒸汽和材料也很多，且产量和质量不易稳定。现代工业生产已有密闭箱式浅盘发酵设备，这种发酵器已应用于生产中，可以较大规模生产许多发酵产品，如酶制剂、酒曲、酱油、食用菌、饲料添加剂等。它的优点是料层厚度薄，发酵时通入的空气经过调温调湿，温度适度控制比较容易，不易污染杂菌，发酵单位高。但缺点是占用面积大。

(二) 旋转式固体发酵设备

旋转式固体发酵设备系将固体培养基接入菌种，放在可旋转的转桶内，旋转式固体发酵罐有鼓型和管型，整个发酵罐以低速间歇式旋转，培养过程中当桶慢慢转动时，罐内的培养物会沿着罐壁滑动，达到散热与空气接触的目的，培养时可通入经过调温调湿的空气，通气及温湿度调节较为均匀，有利于控制微生物生长和产酶的适宜条件。本法的机械化程度较前法稍高，劳动强度也有所减轻，在使用这种发酵器培养微生物时，菌株生长迅速均匀，但是菌丝在生长早期由于翻拌而遭损伤，并易形成团块，影响生长，而且在温度控制和污染等方面还存在不少问题。

(三) 传送带式固体发酵设备

这是使用一组传送带，其生产步骤如下：①将湿麦麸加热至 85°C 以上，并在第一传送带上保持 15min；②在第二传送带上用无菌冷空气将料吹冷至适当温度；③喷上孢子液或用种曲接入料中；④用布料器将接上菌种的培养料分装入无菌的底部具多孔的金属盘中；⑤用空中吊车把金属盘送入培养隧道，并用适宜的温度进行培养至成熟；⑥用吊车把培养好的金属盘送入干燥隧道。这种培养系统虽然机械化程度较高，但温度较难控制，而且投资也较大。

(四) 箱式固体发酵设备

本设备是在浅盘法和竹帘法的生产实践基础上改进而来，将固体培养基经过蒸煮灭菌拌入种曲后，平铺入水泥制的具有多孔假底的大池内，培养基厚度一般在 $20\sim 30\text{cm}$ ，近年来国外已有培养基厚度深达数英尺者（图 3-22）。培养基铺好后，待微生物已开始生长，曲温逐渐升高时，即从池内假底下面通入一定温度和相对湿度的空气，室内同时保持一定的温度和相对湿度进行培养，使微生物能比较均匀适宜地生长繁殖和产酶。箱式机械通气发酵机是由曲箱、空调箱、进料分配箱等组成。本法与前几种方法比较，它的特点是设备生产能力大，保温、保湿效果较好，由于是全封闭式的，制曲时霉菌产生的热量可以循环使用，故节约了热能，同时又保持回风中的相对湿度，发酵中途也无须人工经常翻曲，劳动强度相应轻，目前是固体发酵法中较好的一种方

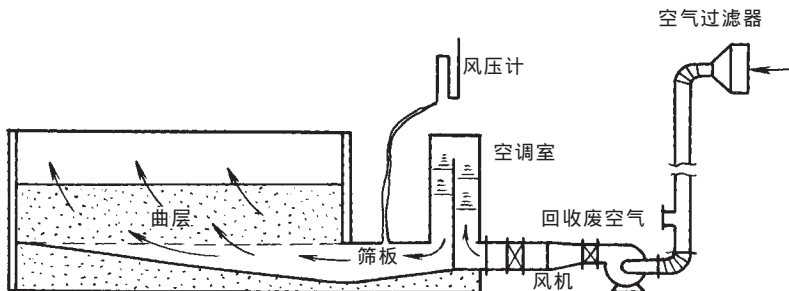


图 3-22 厚层固体发酵装置

法。但是，设备的造价较高。

第八节 发酵工程与功能性食品

随着国民经济发展，人民生活水平提高，人们对健康更加关注。食品作为人类生存和发展的物质基础，其质量和成分对于人体健康的影响是不容置疑的。当今世界食品工作者把食品誉为具有三大功能：一是营养；二是享受；三是食物含有某些生理活性物质，能调节人体功能、提高免疫力、防止衰老等。解决温饱问题的国民对所摄取的食物不但要求能够提供营养素以维持生存，而且还要求其具有调节机体生理的功能。新一代具有保健功能的食品正是在人们的物质生活极大丰富、富裕程度日益提高之时应运产生并迅速发展起来。

功能食品 (functional food) 又称保健功能食品 (functional health food)，是指具有调节人体生理功能，适宜特定人群食用，不以治疗疾病为目的的一类食品。这类食品既具有普通食品的营养功能和感官功能，还具备调节人体生理活动的功能。由于这类食品强调的是食品第三功能，因此称为“功能食品”。

保健功能食品，要强调明确其功能因子。这种功能因子，有些存在于天然动植物中；有些是用化学合成的；有些可以用生物技术来合成，这就是功能性发酵制品。以微生物发酵工程技术合成的功能性发酵食品，其原料往往是糖类，天然无毒，并且生物合成的产品和在动植物中自然存在的化学结构相同，特别是它们在体内能代谢，不会积累产生毒害，符合天然、有效、安全的发展方向。

应用发酵工程制造的功能性食品有很多，比较重要的有碳水化合物类、肽类、多不饱和脂肪酸类、生物防腐剂类等。本节将主要讨论其中部分代表性的功能性食品：真菌多糖、生物活性肽、功能性微生物制剂、功能性微量元素、功能性脂肪酸等。

一、真菌多糖

真菌多糖的研究始于 20 世纪 50 年代，而真菌多糖作为广谱免疫促进剂引起人们极大兴趣则是在 60 年代以后。60 年代至 70 年代，科学家们分别从灵芝、香菇、金针菇等食用菌中分离到多种多糖，并对它们的功能、结构、特性进行研究，证明了真菌多糖不但能治疗机体因免疫系统受到严重损伤而出现的癌症和多种免疫缺损疾病，还能诱导干扰素的产生，而且真菌多糖作为药物，对体细胞的毒性极小。治疗肿瘤时，它不像一般化疗药物那样直接杀死生长着的肿瘤细胞，而是促进细胞和体液产生免疫，如激活巨噬细胞、T 细胞和 B 细胞，从而加强抗体生成及激活补体等，以达到抑制和消灭肿瘤细胞的效果。

真菌多糖除了临床上可用于癌症的免疫治疗，其独特的保健作用也为真菌多糖特别是食用菌多糖在食品工业上的开发利用开辟了广阔的市场前景。近年来，各种食用菌饮料、口服液、酒类等产品相继问世。

(一) 灵芝多糖

灵芝多糖是多孔菌科灵芝属真菌 (灵芝、赤芝、紫芝、薄芝等) 菌丝体的次生代谢物，存在

于灵芝属真菌的菌丝体和子实体中。

灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 是一种木腐菌, 自古被称为能治百病的“仙草”。在我国最早的药典《神农本草经》中, 将它和人参并列为“上上药”。现代医学对灵芝药理作用的评价为: 无副作用; 对人体所有器官的疾病都有保健和医疗效果; 能调节机体的不协调部分, 促使全部内脏或器官的机能正常化, 从根本上治疗疾病。灵芝的化学成分复杂, 而所含的高分子灵芝多糖是其主要活性成分, 它能强化人体免疫系统, 提高对疾病抵抗力的效能, 抗肿瘤作用尤为突出。更为难得的是, 灵芝多糖既可腹腔注射, 也可静脉注射, 口服亦有效果, 因此很适合于做保健食品。在人类食品中, 灵芝可被誉为“健康食品之冠”。

1. 灵芝多糖的结构 由于生产菌种的不同、分离和分析方法的不同以及灵芝多糖的复杂性, 对灵芝多糖的种类及其结构至今仍未完全确定。学者们的研究表明: 灵芝胞外多糖有水溶性多糖和非水溶性多糖; 碱溶性多糖; 多糖同聚物、复杂多糖、中性杂多糖; 酸性多糖; 肽多糖。糖单位有 D-吡喃型半乳糖基、L-吡喃岩藻糖基、D-吡喃甘露糖基、D-吡喃葡萄糖基、D-吡喃葡萄糖醛酸残基、L-阿拉伯糖和 D-半乳糖、阿拉伯糖、木糖等。糖环构型为吡喃糖。糖基主链及支链的连键方式有 β - (1→3)、 β - (1→6) 及 β - (1→4), 也有 α - (1→3)、(1→6) 及 (1→4) 连接。

2. 灵芝多糖的生理功能 灵芝多糖具有广泛的生理活性。灵芝多糖的活性强弱与相对分子质量、溶解度、黏度、多糖链的分叉程度以及支链上羟基取代的数量有关, 也同多糖的连接方式、立体构型密切相关。灵芝多糖相对分子量为 $10 \sim 10^6$, 显示强抑制肿瘤活性。某些具 β - (1→3)D-葡萄糖苷键的非水溶性灵芝多糖部分羧基甲基化后水溶性增加, 抗肿瘤活性同时也增强了。多糖的活性与乙酰基的存在密切相关, 有些含乙酰基的灵芝多糖由于乙酰基的存在, 影响氢键的形成, 进而影响其活性所必需的螺旋形立体结构的形成, 因此活性较差。

有抗肿瘤活性的灵芝多糖大多是由 β - (1→3) 键连接的 D-葡萄糖。在多糖骨架链上占优势的交替 (1→3) 键连接的 β -D-葡萄糖往往具有较明显的抗肿瘤活性。

灵芝多糖的生理功能表现为:

(1) 灵芝多糖能增强细胞及体液免疫功能, 抑制肿瘤细胞增殖。

(2) 灵芝多糖能促进体内血清、肝脏及骨髓的核酸与蛋白质的合成, 加速骨髓细胞的分裂增殖, 提高骨髓抗化学性损伤和物理性损伤的能力; 提高肝脏的解毒功能。

(3) 灵芝多糖具有抗氧化作用, 因此能延缓衰老。

此外灵芝多糖还具有消炎活性, 能降血糖, 对心血管系统有调节作用。

3. 灵芝多糖的生产工艺

(1) 生产方法。作为发酵食品的灵芝多糖的生产发展方向是采用液体深层发酵技术, 即经种子的不断扩大培养进入发酵罐。全过程分种子培养与菌丝体生产两大过程。在液体深层培养过程中, 菌丝细胞能在反应器内处于最适温度、酸碱度、氧气和碳氮比等条件下生成, 呼吸作用所产生的代谢废气又能及时排放, 因此新陈代谢旺盛, 菌丝分裂迅速, 在短期内就能获得大量的菌丝体或菌种。

(2) 灵芝液体深层发酵生产工艺。工艺流程:

斜面菌种培养 → 摇瓶种子培养 → 种子罐培养 → 发酵罐培养 → 过滤 → 浓缩。

斜面菌种培养基一般采用马铃薯培养基,摇瓶种子与斜面培养基相同(去琼脂)。种子罐培养基由蔗糖、豆饼粉和一些无机盐: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCO_3 等组成。种子罐可采用如下培养基和培养条件:蔗糖 2%,豆饼粉 2%, KH_2PO_4 0.075%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%,通气量力 1:0.3~0.5,搅拌转速为 200r/min,28℃下培养 48h。发酵罐培养基可在种子罐培养基的基础上添加适量的氮源。发酵培养基可采用如下培养基:蔗糖 4%,豆饼粉 2%, KH_2PO_4 0.15%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05%,发酵周期为 5~7d,温度 28~30℃。发酵初始 pH 在 5.6~6.5 之间,培养 72h 后,pH 降至 4~5,此时菌丝体生长旺盛。发酵终了时 pH 降至 3.8 左右。发酵液以离心机用干或用板框压滤,所得滤液浓缩至原体积的 10%~20%,制成糖浆可供药用。菌丝体可用于多糖提取。

(3) 灵芝多糖的分离、纯化。灵芝多糖的分离、纯化工艺流程为:菌丝体→预处理→热水浸提或水煎煮(也可用乙醇或稀碱液提取)→离心或过滤→滤液→超滤或减压浓缩→乙醇沉淀→多糖粗制品→脱蛋白→除色素→乙醇沉淀→多糖→离子交换柱层析→浓缩、冷冻干燥→多糖精制品。

① 菌丝体预处理,是在多糖提取前,用酶法、微波或超声波法及用乙醇等有机试剂处理菌丝体,这样可以使多糖充分释放,并可除去原材料中的脂类物质,还可使分解多糖的糖苷酶失活,防止直接提取时多糖降解,从而可提高多糖的提取率。

② 多糖的提取,最常用的是热水提取或水煎煮,也可用稀碱或用乙醇液提取。同一种原料,用不同提取剂提取所得多糖的成分不相同,用稀碱液提取时,多糖的得率要比用热水提取的高;用乙醇提取时,杂质较少,也易过滤。预处理的菌丝体,加 8 倍自来水,于 90~100℃煮 4h,冷却后滤除残渣和不溶物,用超滤或减压方法浓缩至原来体积的 1/15 左右,然后加 3 倍体积的 95%酒精进行沉淀,再在 10 000r/min 下离心分离 5min,去上清液,得多糖粗提物。将粗提物溶解,保持一定浓度,用 Sevag 法脱除蛋白,即加入 0.2 倍体积氯仿和 0.04 倍体积正丁醇混合振荡 30min,静置 10min,以 4 000r/min 离心分 20min,收集上清液。重复上述步骤,至氯仿和水的界面无沉淀为止。然后将上清液用乙醇沉淀,并收集沉淀。

③ 色素的去除,通常采用活性炭吸除法;也有用乙醇反复冲洗去除色素;此外还可用氧化脱色法,即用浓氨水调 pH 至 8.0 左右,滴加 H_2O_2 至浅黄色,在低于室温下保温 24h。

④ 灵芝多糖的纯化,是将多糖配成一定浓度,经硼酸型 DEAE-纤维素柱层析,依次以 0~0.1mol/L 硼砂溶液及 0.05~0.1mol/L 氢氧化钠溶液梯度洗脱,用蒽酮试剂(0.2%蒽酮硫酸溶液)比色测定吸收度,按洗脱曲线收集各吸收峰,浓缩后再进一步冷冻干燥即得精制品。进一步纯化可采用凝胶电泳法。对于糖蛋白类多糖,用亲和色谱法分级纯化,效果更好。

(4) 灵芝多糖纯度鉴定。灵芝多糖的纯度可用凝胶柱层析法鉴定。根据多糖相对分子量范围选择所用凝胶型号,通过检测洗脱液是否存在单一对称峰来判断。

利用电泳法鉴定多糖较为直观,纯多糖为单一带。如采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,在 pH 9.2 的硼酸缓冲液中电泳 1.5h (220V, 20mA),用 0.5%麝香草酚溶液显色,若为单一的条带,则为纯多糖。

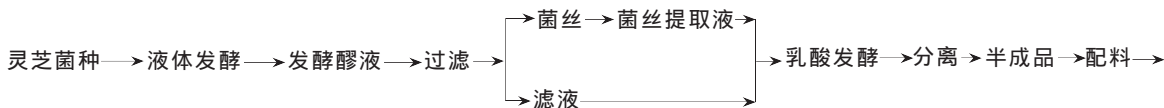
许多用于测定高分子化合物相对分子量的方法一般也可用于多糖,如沉降法、光散射法、渗透压法等,但使用较多的是葡聚糖凝胶柱层析法和高压液相色谱法。

4. 灵芝多糖在保健食品中的应用 灵芝子实体作为一种扶正固本的重要草药成分被列入医

家处方中，同时也常作为药膳的主要成分，将它深加工成易于食用的食品或饮料，利用其中的活性物质灵芝多糖作为保健食品功效成分，有着广阔的前景。目前主要是应用灵芝制成各种保健饮料、口服液、酒类等。

(1) 灵芝乳酸浓缩汁。

① 工艺流程：



冷贮去杂 → 成品包装 → 成品。

② 工艺要点：

灵芝发酵：液体培养基经灭菌、接种，于 28℃、pH 6.0~6.5 下搅拌培养 2d，菌丝开始老化并自溶，即可出罐。醪液经板框压滤分离出滤液。菌丝体用热水浸提，菌丝培养物加 3 倍量水煎煮两次，每次 2h，滤除残渣，合并提取液。浸提液和滤液合并。

乳酸发酵：以发酵滤液或菌丝提取物为原料，加入 6% 蔗糖补充碳源，另补加氮盐及其他盐类，接种乳酸菌（5%~10%），然后于 35~37℃ 下培养 24h 便可放罐，过滤发酵液。

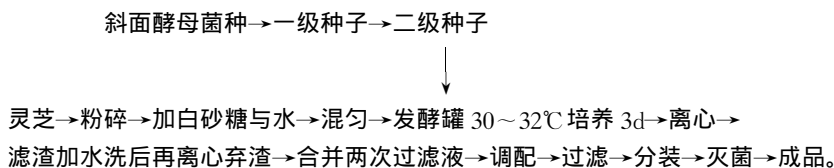
配料：滤液减压浓缩至原液的 1/20~1/30，加入适量的甜味剂和调味剂，混匀，静置，离心去除沉淀。

冷贮：于 1~10℃ 下低温贮存，离心去除沉淀（果胶质），得清亮透明的液体，有乳酸清香味，便可分装。

巴氏灭菌：60℃ 巴氏灭菌，冷却后包装。

(2) 灵芝发酵饮料。

① 工艺流程：



② 原料：发酵原料有灵芝粉、白砂糖、蜜糖。饮料配料有发酵离心液、白砂糖、蜜糖、柠檬酸及柠檬酸盐、食用香料。

③ 产品特点：本产品通过微生物发酵的方法脱去灵芝原有苦味（主要成分为三萜类物质），改善了饮料的口感。

(3) 灵芝菌丝体发酵酒。灵芝菌丝体发酵酒是以灵芝菌丝体为原料，通过机械研磨，使菌丝细胞破裂，内容物全部流出，再经发酵而成。

依据食用菌的生长发育规律，菌丝体是合成营养素阶段，子实体是消耗营养素阶段，所以菌丝体含营养素一般要高于子实体。因此，灵芝菌丝体发酵酒的营养价值要高于或优于以子实体为原料的浸提或浸泡酒，是很好的营养保健酒。

①工艺流程：

培养基→灭菌→接种灵芝斜面菌种→发酵→培养物经胶体磨研磨→过滤→滤液加入蔗糖→接种甜酒药→发酵→稀释装瓶→灭菌→成品。

②工艺要点：将振荡培养物用 0.2 μm 胶体磨研磨，加入 10% 蔗糖，搅溶，过滤，取滤液，加入 0.2% 的甜酒药，摇匀，于 27 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 3d。用蒸馏水以一定比例稀释培养液，装瓶，灭菌。本产品澄清透亮，淡蜂蜜样色泽，口味纯正，有淡淡的蜂蜜香和微醇香。

(二) 香菇多糖

香菇 (*Lentinus edodes*) 是第二大类栽培食用菌，仅次于双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*)。我国香菇品种资源比较丰富，产量居世界首位。香菇不仅是一种美味的食用菌，而且具有相当的药用价值。现代医学研究发现，常食香菇有降低胆固醇、防止血管硬化，有助于儿童生长发育，能增强人体免疫功能和防治癌症的作用。其中能显著增强癌患者抵抗力的生理活性物质来自香菇多糖。

1. 香菇多糖的结构 香菇多糖相对分子质量约为 100 万，是含 β - (1 \rightarrow 6) 和 β - (1 \rightarrow 3) 结合支链的 β - (1 \rightarrow 3) 连接的葡聚糖。香菇多糖分子中除了葡萄糖外，还有少量的半乳糖、甘露糖、木糖等。

2. 香菇的液体深层培养 香菇菌种斜面培养基为常规的 PDA 培养基。培养香菇菌丝的碳源以乙醇、甘油、葡萄糖为佳，单位碳源的干菌丝得率约为 50%。氮源可用黄豆粉、玉米粉、酵母粉、蛋白胨等。如用 1% 的有机酸和 0.5% 的酵母膏组成液体培养基，可取得大量香菇菌丝体。

3. 香菇多糖的提取

(1) 水溶性香菇多糖 (HLP) 的提取。将干菌丝体磨碎，用 80~90 $^{\circ}\text{C}$ 热水浸提 2h，离心得上清液和沉淀。将沉淀用热水重复浸提两次，并收集上清液，经浓缩后用 3 倍体积的 95% 乙醇溶液醇析 24h，离心收集沉淀，再依次用无水乙醇、乙醚洗涤沉淀，反复用 Sevag 法除去沉淀物中的蛋白质，透析 48h 后浓缩，再用 95% 乙醇溶液醇析，醇析的沉淀物经无水乙醇、乙醚洗涤 3 次，干燥后得灰白色粉末状水溶性香菇多糖。

(2) 酸溶性香菇多糖 (ALP) 的提取。在经热水浸提后的沉淀中加 1.5% 三氯乙酸搅拌溶解，2h 后离心得上清液和沉淀。将沉淀重复两次酸提，上清液经 1mol/L NaOH 溶液中和后低温醇析 24h。离心收集沉淀，再用 1.5% 三氯乙酸溶解沉淀物，除去不溶物，用 1mol/L NaOH 溶液迅速中和，再醇析，重复操作 3 次。然后再经 Sevag 法除去蛋白质后透析，醇析得沉淀物。用无水乙醇、乙醚洗涤沉淀物后干燥，得浅白色粉末状酸溶性香菇多糖。

(3) 碱溶性香菇多糖 (BLP) 的提取。在经酸提后的沉淀物中用 1mol/L NaOH 溶液充分搅拌浸提。上清液用醋酸中和后有沉淀物产生。离心收集沉淀物，再用 1mol/L NaOH 溶液溶解沉淀，弃去不溶物，用乙酸中和得沉淀。重复 3 次。所得沉淀溶于 NaOH 溶液，经 Sevag 法除去蛋白质后透析 48h，浓缩醇析得沉淀。沉淀依次用水、甲醇、乙醚洗涤后干燥，得略带褐色粉末状的碱溶性香菇多糖。

4. 香菇多糖在食品中的应用 利用香菇菌经液体深层通气发酵培养可得香菇多糖营养液产品。其生产工艺流程及要点为：

香菇菌试管斜面菌种经一级摇瓶种子→二级种子→三级种子罐→发酵罐→胶体磨→高压匀浆机→离心机→清液→硅藻土过滤机→清液→封罐机→灭菌→包装→成品。

香菇菌液体深层通气发酵原料主要为白糖、大麦、花生粉等食用级常规发酵原料；发酵周期为3~4d。由于香菇多糖主要是胞内多糖，因此先经胶体磨进行菌体初碎，再经高压匀浆机进一步磨碎的处理方法。成品在105℃条件下灭菌30min。

香菇多糖营养液经检测含有香菇多糖、蛋白质、氨基酸、维生素及对人体有益的多种微量元素，其中多糖含量较高。该产品为浅黄色，透明，酸甜适中，有香菇发酵液特有的风味，具有提高细胞免疫功能和抗体形成、增强体质、促进智能发育及抗衰老等作用，是一种理想的保健营养饮品。

(三) 金针菇多糖

金针菇 (*Flammulina velutipes*) 又叫朴菇、冬菇、杨菌等，营养极丰富，含18种氨基酸，其赖氨酸和精氨酸的含量高于一般菇类，故又称为儿童增智菇。金针菇所含的朴菇素 (flam-mulin) 是一种抗癌活性物质，故又是一种很好的保健食品。有学者报道，从金针菇培养液中提取的水溶性多糖有明显抗癌活性，已作为抗癌剂用于临床，并进行工业化生产。

1. 金针菇多糖的结构 金针菇活性多糖结构特征为 β - (1→3) (1→6) 位连接的以葡萄糖-半乳糖为主体的含有少量阿拉伯糖和木糖的一种多糖，相对分子质量为 2.4×10^4 。

2. 金针菇发酵及金针菇多糖分离纯化 用深层发酵法培养高产优质菌株金针菇 FV₈₈₁₂，菌体干得率达3.94%。将菌丝体以98~100℃热水煮后离心 (3 200r/min)；上清液用3倍乙醇沉淀、离心 (3 200r/min)；沉淀物以 Sevag 去除蛋白质5次，流水透析3d，再用3倍乙醇沉淀、离心；沉淀物进行乙醇分级分离后，可再进行柱层析纯化。

3. 金针菇在食品中的应用 随着人们生活水平的提高，食品的保健作用日益引起人们的注意。用金针菇子实体加工制成的保健食品如“金菇露”、“金菇馅饼”等在国际市场上畅销，价格昂贵。但子实体生产量有限，成本高，且受季节限制，因此，采用深层发酵技术工业化常年生产金针菇菌丝体，以替代子实体并用于食品加工，将有广阔前景。

(四) 冬虫夏草多糖

冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) 是我国特有的名贵中草药，分布在青藏高原海拔3500m以上的高原草甸中。由于其严格的寄生性和特殊的生态地理环境，天然资源十分稀少，因此国内外众多研究机构及科研工作者通过生物技术进行冬虫夏草人工培育、筛选富含冬虫夏草多糖并且可以取代天然冬虫夏草的人工培养虫草菌丝体。

学者们已从中得到活性成分虫草多糖，并对虫草多糖的药理及多糖结构进行研究。虫草多糖有提高机体免疫功能、抑制肿瘤细胞的作用；有一定的抗放射作用，可改善化疗引起的不良反应，有利于机体康复。

冬虫夏草多糖分离提取纯化过程：取虫草菌体分离后的培养液（若为天然虫草，将材料粉碎后，用90~100℃热水抽提3次），于90℃下进行浓缩，由离心分离去除残渣，清液部分用3~5倍的乙醇溶液进行沉淀，收集沉淀物，干燥，得褐色粗多糖。粗多糖经纯化，可采用分级提取、超滤、层析法等获得高纯度的多糖。如用不同浓度的乙醇溶液进行分级，取乙醇溶液浓度为70%~80%的沉淀部分用酶法和 Sevag 法联合脱蛋白，用H₂O₂脱色，而后上DEAE-Sephadex A-25 (Cl) 柱层析，以不同浓度NaCl溶液洗脱、蒸馏水透析、减压浓缩、乙醇溶液沉淀、真空干燥，便得纯化的虫草多糖。

虫草多糖结构的研究工作,近年来取得了一定成果。如日本学者从正品冬虫夏草的菌丝体中分离出多糖为半乳聚糖;我国学者张翼伸等从北方蛹虫草(*Cordyceps militaris*)的菌体发酵液中分离的多糖 CM-I 是具有高度分支的半乳糖甘露聚糖,主链为 α - (1 \rightarrow 2) 糖苷键连接的 D-呋喃甘露聚糖,支链由半乳糖基组成。

对冬虫夏草中最主要的生理活性物质,冬虫夏草多糖(cordyceps polysacchride, CP)的研究,将使虫草多糖成为新的抗癌药物和重要的保健食品功能因子之一。目前,许多科研工作者致力于虫草保健口服液的研制,为其应用开辟了新的途径。

还有许多其他食用真菌多糖已被分离并对他们进行了研究,如茯苓多糖、羊肚菌多糖、裂褶菌多糖、木耳多糖、银耳多糖等等。它们不但都具有增强免疫功能、抗疲劳,降血脂、抑制肿瘤生长等药用价值,而且在食品工业中将成为新型保健营养品。

二、生物活性肽

(一) 谷胱甘肽

谷胱甘肽(glutathione, 简称 GSH)是一种具有多种重要生理功能的活性肽,它是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸经肽键缩合而成的,存在于动物、大多数植物细胞及微生物中。谷胱甘肽(GSH)的分子结构中含有一个活泼的巯基-SH,易被氧化脱氢,因而 GSH 具有抗氧化性,能清除自由基,使生物大分子、生物膜免受损害。谷胱甘肽能够作为多种酶反应的辅酶,对生物分子蛋白质的巯基有保护作用,可维持某些酶的活性。临床上谷胱甘肽被用作治疗肝病、重金属中毒、放射线损伤等的药物。在日本,谷胱甘肽还被用作试制功能性食品,如用酵母加工含谷胱甘肽的营养补助食品,开发高含谷胱甘肽的清酒,这些功能性食品目前正走向商品化。谷胱甘肽作为一种多功能的生物活性物质,在食品、医药等领域的应用前景广阔,市场需求量日渐增大。

谷胱甘肽的制备方法有萃取法、化学合成法、发酵法和酶法。过去主要从酵母菌中抽提或用化学法合成,萃取法成本偏高,化学合成法效率高但有化学物质残留。20 世纪 70 年代以来发酵法及酶法合成谷胱甘肽得到了很大的发展,通过诱变处理获得高含量的酵母菌株来生产谷胱甘肽。目前国外已有最新研究用基因工程构建高效表达的酵母菌种并进一步构建种间耦合 ATP 再生系统酶法合成谷胱甘肽。国内关于谷胱甘肽的制备仍处于研制阶段,包括高 GSH 菌种选育、发酵过程优化和产物提取等工作仍在进行中。酶法是利用酵母细胞中含有的天然谷胱甘肽合成酶,通过添加底物来合成谷胱甘肽。

王正刚等利用废弃啤酒酵母细胞内含有高活力的谷胱甘肽合成酶,以及酵母体内存在的 ATP 再生系统,添加前体物质半胱氨酸、谷氨酸、甘氨酸,控制一定条件,可使酵母体内积累 15mg/g(干细胞)以上的 GSH。

福建师范大学生物工程学院施碧红等以谷胱甘肽产生菌啤酒酵母 S-12 经紫外线及硫酸二乙酯复合诱变,得甲硫氨酸缺陷型突变株 M-05,其胞内积累 GSH 水平已经比出发株 S-12 有较大的提高,经培养基、培养条件的优化, M-05 胞内积累 GSH 比原来配方提高了 61.3%。华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室赵旭东等对固定化酵母细胞生物合成谷胱甘肽进行系统研

究,实验表明:利用酵母细胞自身的 GSH 合成酶和糖酵解途径产生的 ATP 能够合成 GSH,但产量不是很高,并且,ADP 抑制 GSH 的合成,而 ATP 的快速有效再生是 GSH 高效合成的必要条件。因此,如果能利用基因工程技术把需要 ATP 才能进行反应的酶基因克隆表达在酵母细胞中,或克隆表达 *E. coli* B 菌种的 GSH 合成酶基因(因为 ADP 对它的抑制作用比酵母弱),或利用廉价的腺苷转生成大量 ATP 进行反应,将会实现高效率、低成本的 GSH 生产。浙江大学化工学院生化系吴坚平等在摇瓶培养中考察了培养基组成,培养条件对产假丝酵母生长和谷胱甘肽合成的影响,发现菌体能够较好地利用葡萄糖和蔗糖。确定初始葡萄糖浓度为 20g/L ,氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$,浓度为 3g/L ,接种量为 10%。在 20g/L 的糖浓时获得的谷胱甘肽总量可达 74mg/L ,胞内含量为 1.4% 左右。无锡轻工大学生物工程学院李寅等研究了面包酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) WSHJ₇₀₁, GSH 的积累株摇瓶发酵中 pH、装液量、初糖浓度、碳氮磷比和补糖方式对谷胱甘肽 (GSH) 发酵的影响。结果表明:GSH 发酵适宜的初始 pH 和装液量分别为 6.0 和 500mL 锥形瓶内装液量 60mL。初糖浓度超过 12g/L 减少胞内 GSH 含量。采用以控制比生长速率为目的的摇瓶补糖策略,在总糖的浓度为 26.2g/L 时发酵 12h,最终细胞浓度和胞内 GSH 含量分别达到 8.78g/L 和 13.6mg/g ,发酵液内 GSH 总量达到 119.4mg/L ,细胞对糖产率达到 0.335g/g 。李寅等还研究了重组大肠杆菌 *E. coli* WSHKE₁ 产 GSH 的发酵条件,结果发现,前体氨基酸和 ATP 均能促进胞内 GSH 的积累;并且采用指数流加葡萄糖培养该菌 25h,细胞干重与发酵液内 GSH 总量比摇瓶最好结果分别提高了 8.3 倍和 4.6 倍。

GSH 的生物合成途径是由 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶与 GSH 合成酶在 ATP 存在下催化 L-Glu、L-Cys 和 Gly 反应合成的。鉴于目前国内有关 GSH 生物合成的研究还停留在实验室阶段,选育具有高 GSH 合成能力的菌株是提高 GSH 合成效率的关键,通过理化诱变选育 GSH 高产菌株,提高 GSH 合成酶系的表达水平,并使之在胞外大量积累。此外,GSH 的合成需要 ATP 的参与,而在反应体系中直接添加 ATP 是经济上所不允许的,引进一个合理有效的 ATP 再生系统对 GSH 生物合成的经济运行至关重要。可以应用基因工程技术,构建一个高效的 ATP 再生系统,提高 GSH 生物合成系统的运行效率与经济性;并且通过固定化细胞培养技术,可实现 GSH 的连续生产。

(二) 乳酸链球菌肽

乳酸链球菌肽 (nisin) 又称乳酸链球菌素,是由乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 的某些菌株产生的一种多肽,它是由 34 个氨基酸组成,分子量约为 3 354。它能有效抑制许多引起食品腐败的革兰氏阳性菌及病原菌的繁殖。纯的乳酸链球菌肽的等电点为 pH9。在低 pH 溶液中溶解度增加,且稳定性高,如把乳酸链球菌肽溶于 pH2 的稀 HCl 中时,经 121°C 加热 30min 而不丧失抑菌活性。毒理和生物学研究表明乳酸链球菌肽对人体安全无毒。1969 年,FAO/WHO 联合食品添加剂专家委员会确认乳酸链球菌肽可作为食品防腐剂。

乳酸链球菌肽广泛用于乳制品、罐头食品、植物蛋白食品、肉制品及乙醇饮料生产中,它能抑制孢子萌发,特别适用于热加工食品防腐保鲜。

中国科学院微生物研究所于 1989 年,开始对乳酸链球菌肽进行基础研究,先后成功完成中试和应用试验,目前生产的产品已投放市场。为提高乳酸链球菌肽发酵液抑菌效价,科研人员吴琼等经过大量筛选工作,得到一株 nisin 高产菌株 9706,并对其发酵条件作了研究:蔗糖作碳源

是影响 nisin 效价的重要因素；nisin 的生物合成与细胞快速生长几乎同步进行，表现为初级代谢动力学特征，而不同于一般的抗生素发酵的次级代谢特征。最近研究表明，nisin 与螯合剂 EDTA 二钠联合使用，能抑制沙门氏菌和其他革兰氏阴性细菌，这不但更加拓宽了 nisin 有食品防腐保鲜中应用的范围，同时还能作为药物用来治疗胃溃疡，因为导致胃溃疡的元凶幽门螺杆菌对 nisin 敏感，而且这种敏感性由于螯合剂的存在而明显增强。

此外，活性肽中的酪蛋白质磷酸肽（CPP）是一种促进钙和铁吸收的肽，它是含有 25~37 个氨基酸残基的多肽。两种 CPP 都在连续 3 个 ser-P 残基后连接谷酰胺基部分（核心部位），核心部位能在 pH 7~8 的条件下有效地与钙形成可溶性复合物（可以防止在各种钙磷比条件下产生不溶性磷酸钙）。因此，CCP 可用于食品的钙强化剂，增强肠道对钙的吸收以及钙在体内的保持。CPP 还可作为许多矿物元素，如铁、锰、铜及硒的载体，是一种良好的金属结合肽。

三、功能性生态制剂

微生态制剂（microecologics）又称微生态调节剂（microecological modulator），可调节机体内的微生态平衡，因而达到治疗或保健目的。益生菌（probiotics）就是在微生物学原理指导下制成的含有大量有益活菌的制剂，其中有的还含有这些微生物的代谢产物，能促进有益菌生长的促进因子。

现已发现乳酸菌类、双歧杆菌类等菌体本身在人体内可以起到一些生理调节作用，增强机体免疫力，增进健康。食用这些菌类发酵的并在最终产品中含有活菌体的食品对人体的健康起着有益的作用。

（一）乳酸菌

乳酸菌是一类可发酵利用碳水化合物而产生大量乳酸的细菌。很早以前，人们就知道乳酸菌是有益于人体健康的细菌。据分析，保加利亚人长寿就是与他们多饮由乳酸菌发酵的酸奶有关。乳酸菌进入人体内即在肠道内繁殖，使肠道菌群发生相应的变化，抑制了病原菌和有害于人体健康的细菌的生长繁殖。乳酸菌及其代谢产物能促进人体消化酶的分泌，还能通过诱导产生干扰素；乳酸菌死菌在体内分解后，其有效成分被人体吸收，能增强人体免疫力，促进肝脏功能或通过肠道菌发挥有益机体健康的作用。

乳酸菌分为乳杆菌属（*Lactobacillus*）、链球菌属（*Streptococcus*）、明串珠球菌属（*Pedococcus*）。与微生态制剂有关的、具有保健、增加机体的免疫力、治疗和防病作用的乳酸菌主要包括：乳杆菌和链球菌。

乳杆菌属为革兰氏染色阳性菌，无芽孢，微好氧，在固体培养基上培养时，通常在厌氧条件或减少氧压充以 5%~10% 二氧化碳时可增加表面生长物，有些菌在分离时就是厌氧的。其生长最适温度一般为 30~40℃。乳杆菌能耐酸，最适 pH 范围通常为 5.5~6.2，在 pH5 以下也可生长。在微生态制剂中常用的菌种是嗜酸乳杆菌（*L.acidophilus*）、保加利亚乳杆菌（*L.delbrueckii* subsp.*bulgaricus*），植物乳杆菌（*L.plantarum*）。分离乳杆菌可采用 MRS 琼脂或 SL 培养基来进行分离。

链球菌属的乳酸菌为革兰氏阳性菌，无芽孢，兼性厌氧。过氧化氢酶反应呈阴性。发酵乳制

品上常用的菌种有：乳酸链球菌 (*S. lactis*) 和嗜热链球菌 (*S. thermophilus*)。嗜热链球菌是我们用于制造酸乳的主要菌种。

乳酸链球菌和其他乳酸菌一样营养要求高，需要复合的培养基才能良好生长。在合成培养基中需要有亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、组氨酸、蛋氨酸、精氨酸和脯氨酸以及维生素类，如烟酸、泛酸和生物素。分离嗜热链球菌可用 Eilliker 琼脂培养基行分离。

乳酸菌还有其特殊功效：在蔬菜、豆类以及豆制品的发酵过程中，能够产生有机酸，使成品富于人们所需要的风味，并能抑制腐败菌及不合要求的微生物生长繁殖。如在豆乳中加入乳酸菌进行发酵，既消除豆腥味和抗营养因子（豆类中含有能使人体红细胞凝集的植物血球凝集素），又能增加某些 B 族维生素，从而改善豆乳的风味和营养价值。又如牛乳经乳酸菌发酵后，乳糖一部分被代谢生成乳酸，另一部分则由乳酸菌分泌的乳糖酶分解，对体内缺乏乳糖酶而患有乳糖不适症的人完全可以食用发酵牛乳及其制品。

（二）双歧杆菌

双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 是一类革兰氏阳性厌氧菌或兼性厌氧菌。它是人乳喂养的婴儿消化道的主要菌丛，可占整个消化道菌丛的 92%，而非人乳喂养的婴儿只占 20% 以下。双歧杆菌在人体肠道中的数量随年龄而变化，婴儿出世后几天菌数达最高值，青壮年时菌含量降低，进入老年期则大幅度降低。据报道，存在于人体内的双歧杆菌主要有 5 种，婴儿期以婴儿双歧杆菌 (*B. infantis*)、短双歧杆菌 (*B. breve*)、双叉双歧杆菌 (*B. bifidum*) 和长双歧杆菌 (*B. longum*) 为主。成年期以青春双歧杆菌 (*B. adolescentis*) 和长双歧杆菌为主。老年期以青春双歧杆菌和长双歧杆菌为主，也有双叉双歧杆菌。

双歧杆菌的最适生长温度为 37~41℃，生长初期最适 pH 为 6.5~7.0。所有的双歧杆菌都发酵葡萄糖、半乳糖和果糖，人体中发现的菌种还能发酵乳糖。实际上，其分解葡萄糖是经过 6-磷酸果糖途径，果糖-6-磷酸激酶将 6-磷酸果糖分解为乙酰磷酸和赤藓糖，最终产生乙酸和乳酸。双歧杆菌代谢产生的乙酸和乳酸，降低肠道 pH，抑制肠道中腐生菌的生长，从而解除腐生菌代谢产物（如吲哚、甲酚、胺等）对肝脏的毒害作用，促使人体的正常代谢。鉴别产品中是否有双歧杆菌，除在形态上鉴别外，代谢产物中的乙酸、乳酸的比值是重要依据，双歧杆菌大于 1，乳酸菌小于 1。

分离双歧杆菌一般采用胰酶解酪朊、植物蛋白胨、酵母抽提物等配制的 PTY 培养基，在严格厌氧条件下进行分离。

（三）生产工艺

目前市场出售的微生态制剂有用冻干粉制成的胶囊、片剂、粉剂或制成微胶囊。此外还有水剂与酸奶，如：丽珠肠乐、三株口服液、五株口服液、双歧天宝口服液等。以医用微生态制剂的生产工艺而论，不管以何种状态上市，都包括如下工序。

1. 生产种子液 将经过选育纯化的菌种，按其生长条件要求（pH、温度、营养条件等，厌氧或兼性厌氧）逐级扩大成种子液。

2. 生产培养 将种子液接种到灭菌冷却的发酵罐培养基中进行培养。乳酸菌和双歧杆菌等均均为厌氧菌或兼性厌氧菌，无需往罐内通气。

3. 浓缩 待发酵液中菌体生长量达高峰时，在封闭无杂菌条件下进行浓缩（离心或超滤）。

4. 真空冻干 将细胞浓浆加入冻干保护剂进行真空冻干,测定每克所含活菌数。

5. 封装成品 冻干粉按规格制成片剂或胶囊。

水剂状态的微生态制剂,因其不耐储藏,难以保证质量,在国际市场上甚少采用。但我国市面上水剂状态的不少。从保证微生态制剂的功效角度看,应该发展冻干粉,制成微胶囊或胶囊剂型。

(四) 微生态制剂的质量

一个较好的微生态制剂其标准是:①含一种或几种高质量的有效菌株(种);②活菌含量高;③保质期长,在此期限内不应低于原初一半的活菌数;④具有良好的微生态调节和其他保健功能;⑤制剂具有较强的抗氧、抗胃酸和抗胆汁酸功能(可采用胶囊等剂型);⑥尽可能添加双歧因子类可促进外源性和内源性有益菌增殖的物质;⑦稳定、安全、可靠、质优、价廉。

四、发酵法生产功能性微量元素

人体所必需的微量元素尽管需要量很少,但它们都有极其重要的生理作用。微量元素中有些在天然食品中含量很低,如硒、锗等,需用人工方法将其无机盐转化为有机物,以提高其生理活性和吸收率,同时降低其毒性。利用微生物转化后的微量元素以类似天然食物中的有机物形式存在,人食用后起到了应有的生理功能。酵母具有高度富集硒、锗等的能力以及将它们由无机转化为有机能力,同时其食用安全性较细菌更高,生长周期短,生物产量高,生长条件要求不苛刻,通气与不通气发酵均可,发酵过程不易被污染,易于转化投产。此外,食用真菌同化无机元素硒、锗等的能力也较强,而且食用菌的食用历史悠久,其菌体安全性已为历史所证明,更宜于用作食品或食品添加剂。如在灵芝培养基中有意加入无机锗后,灵芝的活性有机锗含量明显增高。

(一) 富硒微生物制剂

硒是人体必需的微量元素,天然食物含量较低,而矿物质亚硒酸钠等无机硒对人体的毒性太大,只能用于医药达到治疗的目的,不能用于食品达到补充营养的目的。通过生物转化使无机硒变为有机硒,可以提高硒的生理活性与吸收率,并降低其毒性。目前常用的除了植物天然合成法(如富硒茶叶)、种子发芽转化法(如富硒麦芽或豆芽)外,主要以微生物转化法生产富硒食品添加剂。

1. 富硒酵母

(1) 菌种。转化硒的酵母菌常用的是啤酒酵母。

(2) 培养基成分。

①试管培养基:葡萄糖 2.0%、甘氨酸 1.0%、酵母粉 0.1%、琼脂粉 2.0%, pH6.0。

②摇瓶培养基:麦芽汁 12~13°Be', 亚硒酸钠 5mg/kg。

③发酵培养基:同摇瓶培养基。

(3) 深层发酵工艺要点。按啤酒生产中麦芽汁制造的方法,制取 12~13°Be'的麦芽汁,计算并加入适量的预灭菌的亚硒酸钠溶液,使最终培养液中硒含量达 5mg/kg。按 8%~10%的量接入酵母菌种,维持温度 30℃,通气比(体积比)为 1:1.6/min 条件下,发酵培养 30~35h。

当发酵液 pH 降至 4.2~4.5, 发酵已达 30~35h 后, 用高速离心机分离出酵母菌, 以自来水反复冲洗, 以洗去附着于菌表面的亚硒酸钠等, 于 55~60℃ 下干燥至含水量 12% 以下, 粉碎后即得淡黄色的富硒酵母粉添加剂。

2. 富硒的食用菌丝体 天然食用菌的硒含量很低, 部分新鲜食用菌的含硒量见表 3-17。

表 3-17 部分食用菌鲜品含硒量 (mg/kg)

菌名	香菇	平菇	猴头菇	金针菇	草菇	银耳	毛木耳	黑木耳
含硒量	0.53	0.25	0.19	0.10	0.07	0.27	0.14	0.02

由表 3-17 可见, 尽管在食物中某些食用菌如香菇、银耳等含硒量较高, 但其含量远不能满足作为食品添加剂的需要量。当在食用菌的培养料中加入适量亚硒酸钠后, 长出的子实体中的硒含量明显提高, 见表 3-18。

表 3-18 培养料中硒加入量与食用菌硒含量 (mg/kg)

硒加量	香菇	平菇	金针菇	凤尾菇
0	0.53	0.25	0.10	0.28
10	9.52	12.51	17.02	7.24
50	92.42	60.32	46.54	70.42
100	—	108.7	—	—

在一定范围内 (培养料中加入量为 0~100mg/kg), 食用菌中硒含量与培养料硒含量成正相关关系, 菌丝体中与深层发酵液中硒含量基本上也遵循这一关系。

发酵生产富硒食用菌丝的方法基本同前面所述的深层发酵法。所不同之处在于应向深层发酵液中加入适量的亚硒酸钠溶液, 一般所用浓度为 50~70mg/kg, 用量超过 100mg/kg 后, 将显著影响菌丝体产量。

(二) 富含有机锗的微生物制剂

锗对人体的营养保健作用与其存在形态有关。无机锗没有明显的生理活性, 只有部分有机锗如 ^{132}Ge 才有肯定而明显的生理活性。锗在天然食物中存在极为广泛, 但含量均很低, 大部分在 1mg/kg 以下, 只有部分海产食品超过 1mg/kg, 如煎食小鱼 3.63mg/kg、金枪鱼 2.28mg/kg、海蚌 2.03mg/kg、大麻哈鱼 1.23mg/kg、沙丁鱼 0.93mg/kg。利用微生物菌体对无机锗进行生物富集转化, 则可以制成富含生物有机锗的微生物制剂。常以酵母菌制成富锗酵母制剂。

1. 菌种 一般采用葡萄酒酵母或啤酒酵母进行生物转化与富集。

2. 锗源 多以锗的氧化物 GeO_2 为锗源。

3. 培养基组成

(1) 试管培养基。麦芽汁 10°Be', 酵母膏 0.5%, Ge (以 GeO_2 折计) 100mg/kg, 琼脂 2%。

(2) 摇瓶培养基。基本同试管培养基, 将加锗量改为 60mg/L 即可。

(3) 发酵培养基。麦芽汁 10°Be'、酵母膏 0.5%, Ge (以 GeO_2 折计) 1200mg/L。

4. 发酵工艺流程 经 25℃ 培养 20h 的试管菌种接入摇瓶液体培养基中, 20℃ 先静置 6h 后再 120r/min 振荡 16h 制备种子液; 以 10% 接种量接种, 20℃ 条件下, 以体积比为 1:1.5/min 的通气比进行发酵。

发酵结束后,用高速离心机分离出酵母菌体,并以自来水充分洗涤,以洗去酵母菌表面附着的无机锗化物。将离心所得洁净浓酵母乳通过板框压滤机,除去水分。生产中最好采用风压板框,向板框内吹入压缩空气,以尽量挤去水分。将所得湿酵母块在 60℃ 下烘干、粉碎,即得 Ge 含量高达 900mg/kg 的淡黄色富锗酵母。

五、功能性不饱和脂肪酸

(一) γ -亚麻酸

1. γ -亚麻酸及其生理功能 γ -亚麻酸 (γ -linolenic acid, GLA) 是一种有 18 个碳原子、含 3 个不饱和双键的直链脂肪酸,为全顺-6, 9, 12-十八碳三烯酸, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}]$, 是人体必需的三种不饱和脂肪酸(亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸)之一,它作为合成人体前列腺素的前体物质,在人体内扩张血管、抑制血液凝固、调节体内胆固醇代谢及增强免疫功能等方面起着十分重要的作用,被认为是具特殊医疗保健作用的营养素。临床已将 γ -亚麻酸用于预防和治疗动脉粥样硬化、血栓、高血脂及高血压、糖尿病等疾病。

2. γ -亚麻酸的发酵生产 由于必需脂肪酸 γ -亚麻酸的重要生理功能,以及当代消费者对食品中脂肪含量的敏感,人们越来越多地热衷于接受富含 γ -亚麻酸等多不饱和脂肪酸的油脂。现代医药工业和轻工业十分重视 GLA 的资源开发研究。

GLA 的来源过去以从月见草子中提取为主,但是月见草种子的产量和含油量不很稳定,受气候、产地等条件的影响较大,且精炼成本高,不能满足市场的需求。20 世纪 80 年代初,世界各国学者开始寻求利用微生物资源来生产 γ -亚麻酸。许多微生物包括被孢霉属 (*Mortierella*)、根霉属 (*Rhizopus*)、鲁氏毛霉 (*Mucor rouxianus*) 之类真菌,曲霉属 (*Aspergillus* sp.) 和螺旋藻属 (*Spirulina*) 的某些菌株能产生含 γ -亚麻酸的油脂。如螺旋藻属含有 10% 类脂物,其中 γ -亚麻酸占类脂物总量的 20%~25%。被孢霉属的真菌产油脂能力较高,其中有的形成 γ -亚麻酸占总油脂的含量可达 8.3%。海洋绿藻中的小球藻菌株产 γ -亚麻酸的含量占总脂肪酸的 37.9%。通过原生质体紫外线诱变和微波处理等微生物育种方法可得到 γ -亚麻酸的高产变异菌株。李植峰等采用理化诱变方法获得已达到工业化生产要求的高产 GLA 的拉曼被孢霉菌株 F₅。

在微生物中, γ -亚麻酸等多价不饱和脂肪酸通常是以单不饱和脂肪酸油酸为底物,合成途径中有两个主要的反应,即碳链的延长与去饱和作用。链延长是供体(乙酰 CoA 或丙二酰 CoA)上的两个碳原子被引入增加碳链长度。去饱和则由脱饱和酶催化完成的。

用于工业化生产 γ -亚麻酸油脂的菌种通常要求:单位培养液菌体得率高(>20%);油脂含量接近或超过一般的油料植物(25%~50%);油脂中 γ -亚麻酸含量高(5%~15%);能适应在高浓度培养基中的培养,以达到菌体产量高、发酵罐利用率高的要求。

发酵法生产 γ -亚麻酸可用 18 碳烷、淀粉及其水解物或糖蜜、葡萄糖等作为碳源,另外添加非离子表面活性剂吐温 20、微量元素铁离子等对发酵形成 γ -亚麻酸有利。

一种实验室用的发酵条件是将选育好的深黄被孢霉 (*Mortierella isabellina*) 菌种接种至斜

面培养基上,在 28℃ 保温培养 4d 以活化菌种;活化后菌种转接至装有 100mL 种子培养基的三角瓶中,于 30℃ 下摇瓶 (150r/min) 培养 2~3d,此为种子液。种子液再扩大培养成发酵母液,即往装有 150mL 母发酵培养液的 500mL 三角瓶中接种 2%~3% 的种子液,于 30℃ 下摇瓶 (150 r/min) 培养 4d,成为发酵母液。在培养基装液量为 20L 或 30L 的发酵罐中,接种 5% 的发酵母液,保持罐温 30℃ 和罐压 50kPa,通气比为每分钟 2L/L,搅拌速度 400r/min,在此条件下发酵培养 4d。生产发酵培养液以葡萄糖、麦芽汁或糖蜜为基础,添加有机氮(如酵母膏、蛋白胨、鱼粉等)、无机氮[如 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、尿素、 K_2HPO_4 等]和无机盐(如 NaAc、 NaNO_3 、 MgSO_4 等)。其培养基配方为(%):葡萄糖 10、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5、NaAc 0.3、 K_2HPO_4 0.1、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05,酵母膏 0.02 和蛋白胨 0.01。

菌种在发酵培养前期主要消耗培养液中以氮源为主的营养物质。吸收利用蛋白质增大菌体细胞体积,保证菌体代谢旺盛。从第三天开始以消耗碳源为主,培养液中糖度急剧下降,菌体细胞分裂程度剧烈上升,菌体增殖数量以几何级数递增。进入对数生长期,菌体细胞内油脂蓄积增加。从显微镜观察,培养前期菌体呈菌丝状,较细,分支多,脂肪粒少。培养后期,菌丝状细胞逐渐膨大,合成并积累大量油脂,细胞内脂肪粒逐渐增大、增多、分支丝状菌体逐渐裂变成肥大类型,内含脂肪粒大且密集。

由于油滴存在于菌体细胞内,需采用球磨机或高压匀浆机将菌体细胞进行机械破碎。充分研磨后的破碎菌体可先用乙醇后用正己烷分步抽提油脂,也可用氯仿:甲醇=2:1(体积比)混合溶剂抽提油脂,也可用超临界 CO_2 萃取法提取油脂。分析表明,菌体得率为 25%~30%,油脂含量 40%~45%,其中 γ -亚麻酸含量为 5%~12%(典型值 8%)。微生物发酵生产 γ -亚麻酸油脂是一项先进的生物技术,不仅是开辟油脂新资源的一个良好开端,而且其应用开发前景极其广阔。

3. γ -亚麻酸在食品工业中的应用 γ -亚麻酸除在医药上治疗人体心血管系统疾病外,还具有一定的减肥疗效,可作为保健食品的有效成分或作为食品添加剂加到饮料、果汁、果子冻、饼干、巧克力、口香糖等食品中,特别可应用于制造婴儿食品强化剂,制造 γ -亚麻酸的婴儿营养奶粉及适宜于孕妇与哺乳期妇女的营养奶粉。

(1) 添加 γ -亚麻酸的奶与奶粉。从被孢霉属真菌油脂中提取出 γ -亚麻酸,添加到奶或奶粉中可提高其营养价值,使之接近于母乳。发酵所得 γ -亚麻酸需要使用环糊精特别是 β -环糊精做载体加到牛奶或奶粉中,充分混合均匀后,即可得到 γ -亚麻酸分散均匀的牛奶或奶粉。 γ -亚麻酸的添加量要控制其在牛奶和奶粉中含量分别为 0.05% 和 1%。

(2) 添加 γ -亚麻酸等不饱和脂肪酸的乳化饮料。牛乳的营养价值很高,含有 3% 乳脂肪、3% 蛋白质、4.5% 乳糖和大量以钙为主的矿物元素,但其中所含饱和脂肪酸却是一个不安全因子,同时因其中所含的乳糖需经人体肠道内的乳糖酶水解成葡萄糖和半乳糖后方能被小肠吸收,因而健康人中有相当一部分因肠道内没有乳糖酶而患有乳糖不适症。若以富含 γ -亚麻酸等不饱和脂肪酸的功能性油脂为油相,用乳糖酶对脱脂乳中的乳糖进行水解,以此溶液为水相,添加适量乳化剂,制成水包油型乳化饮料代替牛乳,既可避免乳糖不适症,又可预防动脉硬化。

(二) EPA 和 DHA

构成中性脂肪的脂肪酸部分,含有饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸两类:二十碳五烯酸(eicos-

apentaenoic acid, 简称 EPA) 和二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, 简称 DHA), 均属于多烯不饱和脂肪酸。

自从 1972 年报道了富含 ω -3 多烯不饱和脂肪酸 (PUFAs) 的海洋食物对冠状动脉粥样硬化有治疗作用以来, 人们对 ω -3 PUFAs, 主要是 EPA 和 DHA 的研究越来越多, 发现它们广泛存在于海洋鱼油之中 (三文鱼、金枪鱼等), 有益于人类健康, 对人类的许多疾病和生理失调有预防和治疗作用, 特别是能预防和治疗动脉粥样硬化、血栓形成和高血压等心血管疾病、炎症和某些癌症。

1. 二十碳五烯酸 (EPA) 人们通过对二十碳五烯酸的营养和医药价值及生产方法的研究发现: 二十碳五烯酸 (EPA) 对防止和治疗血栓、动脉硬化及其他血液循环系统疾病等具有明显效果, 其主要来源是一些海洋鱼类的鱼油, 但鱼油中二十碳五烯酸的含量偏低, 因此人们发现了其他来源, 如藻类、苔藓以及一些微生物等。

1964 年, Hulanicka 等人报道了苔藓 *Euglena gracilis* 含有二十碳五烯酸。1979 年, Gellerman 和 Schlenk 发现真菌 *Saprolegnia parasitica* 含有二十碳五烯酸。1984 年, Scto 等人发现海藻 *Chlorella minutissima* 产生二十碳五烯酸。1986 年, I. Wamoto 报道了淡水藻 *Monodus subterraneus* 产生二十碳五烯酸。1987 年 Wirsén 等人, 报道了利用海洋细菌产生二十碳五烯酸。1988 年 Shimizu 等人利用真菌 *Mortierella alpiua* LS-4 在一定条件下产二十碳五烯酸油脂, 达到 27mg/g 干菌体。Cohen 和 Kyle 等人利用藻类 *Porphyridium cruentum* 和 *Navicula saprophilla* 产生二十碳五烯酸。1991 年, Yongmanitchai 等人探讨了不同培养条件对 *Phaeodactylum tricornutum* 生长和产二十碳五烯酸产量的影响, 发现在最佳培养条件, 培养液中二十碳五烯酸产量达到 133 mg/L。1992 年, Kendrick 和 Ratledge 研究了 7 株真菌中多不饱和脂肪酸含量, 发现 *Thraustochytrium aureum*, *Schizochytrium aggregatum*, *Saprolegnia parasitica* 3 株菌株的二十碳五烯酸含量较高。国内在这一领域研究尚属空白。

2. 二十二碳六烯酸 (DHA) 二十二碳六烯酸 (DHA) 是神经组织的基本组分, 是一种人体必需脂肪酸。人体中进行的 DHA 生物合成能力极其有限, 因此从饮食食物中摄取补充足够的 DHA 十分重要。特别是婴幼儿, 缺乏 DHA 会影响智力、视力和生理发育。尽管海洋鱼油是目前 DHA 的最普遍来源, 但鱼油的产量和脂肪组成是随季节、产地、鱼种及鱼食物链 (即海洋微生物类型) 而变化的, 且鱼油的脂肪酸组成十分复杂。因此鱼油无论是数量还是质量都难以满足人们对 DHA 的需求, 需要探索 DHA 的新来源。利用生物技术生产 DHA 是发展方向。目前研究得最多的是用海洋真菌和藻类生产 DHA, 其中用海洋藻类 *Cryptocodinium cohnii* 生产富含 DHA 的单细胞油脂已达工业化规模, 而且产品的稳定性、纯度、安全性和生物利用率都优于鱼油, 目前已应用于婴儿奶粉和作为辅助食品。

海洋真菌中研究最多的是 *Thraustochytrium aureum*, 通过优化培养条件, 发酵液中 DHA 含量达 270mg/L。最新的报道, 使用另一菌株 *Thraustochytrium aureum* ATCC₂₈₂₁₀ 可使发酵液中 DHA 含量达到 2 000mg/L。

微生物真菌发酵法生产多不饱和脂肪酸 (PUFA) 已成为国际上发展的趋势, 微生物生长周期短, 繁殖力强, 可以集约化大规模生产, 不受季节的限制, 而且油脂成分更接近母乳, 营养学上独具特点。但真菌发酵法生产 PUFA, 所选的菌株需要综合考虑菌体得率、菌体油脂含量及油

脂中 PUFA 的比例三个因素,既要保证菌体的增殖量,又要有较高的碳源转化率。通常在菌体中油脂含量高的培养条件下(高碳浓度、低氮浓度),菌体的增殖量及碳源的转化率都很低,因此选择的菌体如能把多种矛盾统一起来,确定其培养条件,就有可能发酵生产 PUFA。

海洋微藻中研究最多的是 *Cryptocodinium cohnii*,这种微藻不仅产生高含量的 DHA,而且是异养微生物,培养中不需光照,有利于大规模工业化生产。并且,*C. cohnii* 在实验室中培养已有相当长的历史,可追溯到 1908 年,大量的研究报告从未显示这种微生物具有致病性或毒性。

C. cohnii 的培养方式同一般的微生物发酵过程。种子接入摇瓶培养,经过 6 级逐级放大培养,最终在 120m³ 主发酵罐中培养。培养基中含有 NaCl、CaCl₂、MgSO₄、葡萄糖和酵母浸出汁或植物蛋白水解液。温度、pH、通气、压力、搅拌、溶解氧等连续监测和控制。当细胞浓度和脂肪酸含量达到要求后,通过离心和喷雾干燥收获藻体。

藻体中 DHA 提取方法与一般的植物油提取法相同。用己烷将生物体中的油脂抽提出来,真空蒸去溶剂,低温去除饱和度较高的油脂部分。再通过常规操作脱色除臭,将油脂进一步精制。获得的澄清透明的 DHA 油脂后再用富含油酸的葵花油稀释至 DHA 含量达到 40% 的工业标准。

微藻产生的 DHA 单细胞油脂和鱼油相比,不含其他的长碳链多烯脂肪酸,作为助氧剂的重金属离子含量也较低,所以它的氧化稳定性比鱼油好得多。在典型的储存条件(-20℃或+14℃)下,DHA 单细胞油脂可以保持稳定数月,这种油脂感观特性好,易于被人接受,而且能经受严酷的食品加工过程而依然保持原味。现在,DHA 单细胞油脂的生产已经工业化,并被用于婴儿奶粉和以胶囊形式作为辅助食品。它的优良性能使它可以具有比鱼油更广泛的新用途。

EPA 和 DHA 均为微生物脂肪酸代谢中 ω -3 途径产生的。亚油酸引入一个双键后形成 α -亚麻酸,然后进一步的碳链延长和去饱和作用就产生 EPA 和 DHA。

从微生物或微藻中培养发酵生产高度不饱和脂肪酸要比从海洋鱼油中提取有明显优点。特别是利用了生物技术,微生物种子和生长条件都可以严格控制,产品的产量和质量都有了保证。而且可以利用基因修饰、菌种筛选和突变等手段,提高微生物生产 DHA 的产量和纯度。

第九节 发酵工程与食品添加剂

近年来,随着人民生活水平的不断提高,人们对食品的营养、质量和品种的多样化都提出了更高的要求。为此,研究和开发各种食品添加剂,对于发展我国的民族传统食品,开创名、优、特、新产品,是十分必要的。食品添加剂是指为改善食品的品质和色、香、味,以及为防腐和加工工艺的需要而加入食品中的化学合成物质或天然物质。根据来源,可将食品添加剂分为化学合成的、天然物提取的和生物合成的。但在世界回归大自然的影响下,人们对化学合成食品添加剂的疑虑增加,因此采用微生物发酵法生物合成的食品添加剂是发展方向。用发酵的方法可生产的食品添加剂主要有:增稠剂、品质改良剂、抗结剂、酸味剂、抗氧化剂、发色剂、着色剂、防腐剂等。

一、黄原胶的发酵法生产

黄原胶 (xanthan gum) 别名汉生胶、甘蓝黑腐病黄单菌胶, 又称黄单胞多糖, 是国际上 20 世纪 70 年代发展起来的新型发酵产品。它是由甘蓝黑腐病黄单胞细菌 (*Xanthomonas campestris*) 以碳水化合物为主要原料经通气发酵、分离提纯后得到的微生物胞外多糖, 是一种高分子酸性胞外杂多糖, 其作为新型优良的天然食品添加剂用途越来越广。

(一) 黄原胶的工业化生产

1. 生产菌种 黄原胶生产有广泛的微生物来源, 黄单胞菌属的许多种类菌株都能产生黄原胶。目前, 国内外用于生产黄原胶的菌种大多是从甘蓝黑腐病病株上分离到的甘蓝黑腐病黄单胞菌, 也称野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*)。生产黄原胶的菌种还有菜豆黄单胞菌 (*X. phaseoli*)、锦葵黄单胞菌 (*X. malvacearum*)、胡萝卜黄单胞菌 (*X. carotae*)、常春藤叶斑病单胞菌 (*X. hederac*)、半透明黄单胞菌 (*X. translucens*) 等。此外, 通过诱变育种, 筛选细胞壁合成缺陷或某些抗生素抗性菌株可能获得黄原胶高产菌株。为了避免生产菌株退化和变异, 要尽量限制菌株的传代次数, 避免将菌株长期保存在琼脂斜面上。高产菌株最好用冷冻干燥或无营养液保存。

1961 年美国农业部首先发现微生物发酵生产黄原胶。1964 年美国 Merck 公司 Kelco 分部开始生产黄原胶。1969 年, 经毒理学和安全性试验, 美国食品和药物管理局 (FDA) 批准黄原胶可在食品中应用。1983 年, 在罗马会议上黄原胶被世界卫生组织批准为一种新的食品添加剂。我国对黄原胶的研究起步较晚, 进行开发研究的单位有南开大学、中科院微生物研究所、山东食品发酵研究所等, 已开发出的菌株有南开-01, 山大-152、008、L₄ 和 L₅。这些菌株一般呈杆状, 革兰氏染色阴性, 产荚膜。在琼脂培养基平板上可形成黄色黏稠菌落, 液体培养可形成黏稠的胶状物。目前全国有山东烟台、江苏金湖等数家食品级黄原胶生产厂, 年产量 200t 左右, 主要用作食品添加剂。

中国农科院研究生院等研究部门对黄原胶的发酵工艺及提取工艺也进行了深入的研究。目前国内外对黄原胶的生产及应用研究逐渐深入, 生产和销售也逐渐增大。

2. 发酵工艺流程 已有报道的关于黄单胞菌多糖黄原胶生产工艺流程为:

斜面种子 → 一级种子 → 二级种子 → 罐发酵 → 提取 → 离心 → 烘干 → 粉碎 → 过筛 → 产品。

3. 黄原胶的发酵培养基及发酵过程控制

(1) 发酵培养基。

①碳源: 生产黄原胶的最好基质是 D-葡萄糖, 其他适于生产的碳源是淀粉、谷粒水解物、玉米糖浆或葡萄糖浆、蔗糖等糖类和碳水化合物。国外多数以葡萄糖为碳源进行黄单胞菌多糖的发酵, 国内则多以淀粉为碳源, 也有以蔗糖为碳源的。在黄单胞菌细胞分泌的酶催化作用下, α -1, 6-糖苷键被打开, 形成直链多糖, 经进一步生物转化, 最终变成产物黄原胶。黄原胶的收率取决于碳源的种类及发酵条件的控制。碳源的起始浓度可控制在 2% ~ 5%, 一般收率为起始糖量的 40% ~ 75%。当葡萄糖浓度在 5% 时, 黄原胶得率最高。

②氮源: 通常, 黄单胞菌易利用有机氮源, 而不易利用无机氮源。有机氮源包括鱼粉蛋白

胨、大豆蛋白胨、鱼粉、豆饼粉、谷糠、干酒糟可溶物、玉米浆、小麦汁、酵母膏、尿素等。鱼粉蛋白胨对产物的生成有明显促进作用，浓度以 0.4%~0.6% 为宜。而鱼粉和豆饼粉对于工业规模生产黄单胞多糖是比较经济的。

氮源的用量直接影响到细胞的生长。培养基中氮源浓度提高，则细胞浓度增加，进而间接地影响黄原胶合成速率及最终得率。在氮源浓度较低时，随氮源浓度的提高，细胞浓度也增加，黄原胶的合成速率加快，黄原胶得率也相应提高。起始氮源在中等浓度时，细胞浓度和黄原胶的合成速率均有提高，发酵时间缩短，但黄原胶得率却降低，这是因为细胞生长过快，使用于细胞生长及维持细胞生命的糖量增加，用于合成黄原胶的糖反而减少，导致黄原胶得率下降。如果采用发酵后期流加糖的方法，使糖浓度始终维持在一定的水平，补加的糖只用于细胞维持生命及合成黄原胶，而没有生长的消耗，因而得率比间歇发酵有较大提高。若起始氮源的浓度再提高，虽然细胞浓度有所增加，但黄原胶得率及合成速率却降低了，其主要原因是“氧限制”，高浓度细胞随着发酵的进行，发酵液黏度不断增大，体积传质系数降低，造成氧供应能力逐渐下降，合成速率变慢，得率降低。要避免“氧限制”，必须从两方面考虑：一是通过改进发酵设备，提高供氧能力；二是限制细胞浓度，控制氧的需求量。总之，发酵罐的供氧能力是决定发酵好坏的一个重要因素。

③无机盐： K_2HPO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、轻质 $CaCO_3$ 等无机盐对发酵有一定的促进作用，轻质 $CaCO_3$ 还有缓冲 pH 的作用。

用由 D-葡萄糖 2.1%、干酒糟可溶物 0.8%、pH7.0 的 K_2HPO_4 0.5% 和 $MgSO_4$ 0.01% 溶于自来水中配制成的标准培养基，摇瓶培养 2d，发酵液中胶含量可达 1.4%。若用氢氧化铵控制 pH (pH7.0)，则培养物的黏度增加，含多糖 2.6%。当小麦汁中补加少量干酒糟可溶物时，产物更多。以玉米浸液或蛋白胨为氮源，粗产品的得率最高，分别为 2.88% 及 3.01%。

④其他添加剂：除必要的碳源、氮源及无机盐外，培养基中还需加一些金属离子及其他添加剂，如 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 等微量元素以及脱氧胆酸盐、胆盐、谷氨酸、柠檬酸、延胡索酸等，促进黄原胶的生物合成。

通常采用葡萄糖或蔗糖 20g、酵母膏 1g、牛肉膏 3g、蛋白胨 5g、NaCl 5g，加水 1000mL 配成种子培养基，500mL 三角瓶中装 200mL 培养液于 78~98kPa 下灭菌 20min，冷却后接入生长良好的试管斜面菌种，在 28~30℃ 下摇瓶培养 24~48h，即得到种子培养液。镜检种子健壮，即可接入种子罐中通气培养。

下面是一种黄单胞杆菌培养基配方 (g/L) 的组成：淀粉或蔗糖 40、 KH_2PO_4 5.0、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2、 $(NH_4)_2SO_4$ 2.0、柠檬酸 2.0、 H_3BO_4 0.006、ZnO 0.006、 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.0024、 $CaCO_3$ 0.002，用 HCl 调至 pH 7.0。

(2) 发酵条件及发酵过程控制。黄原胶发酵的产量和质量除了受发酵培养基组成成分的影响以外，还取决于发酵过程中所有发酵参数的控制，如温度、溶解氧、pH 和剪切速率等。

①温度：黄单胞菌的最适生长温度为 24~27℃，最适产黄原胶的温度为 30~33℃。因此，采用分段控制温度为宜，在发酵产胶期将发酵温度由 27℃ 调整至 32℃，有利于细胞生长和产黄原胶。

②pH：黄单胞菌多糖的合成受发酵培养基的起始 pH 影响，发酵过程中用 KOH 控制 pH

6.5~7.5, 最适 pH 为 7.0, 这有利于初期的细胞生长和后期的黄原胶合成。在发酵期间, pH 控制要严格, 如不控制 pH, 则随时间延长, pH 降低, 直至 pH 5.0 时, 黄原胶的生成率就大大降低。当起始葡萄糖浓度为 5%, 用 KOH 控制至 pH 7.0, 84h, 黄原胶浓度为 3%; 用 NH_4OH 控制 pH, 46h, 其浓度可达 2.6%; 不控制 pH, 36h, 其浓度从 2% 下降至 1.4%。表明即使原培养液黏度较高, 只要控制好条件, 可以得到发酵产率和质量高的黄原胶。

③接种量: 摇瓶发酵接种量为 1%~5%, 旋转式摇床转速 $220 \gamma/\text{min}$, 培养温度 28°C , 发酵 72h 左右。发酵结束, 黄原胶产生能力为 $20\sim 30\text{g/L}$, 对碳源的转化率在 60%~70%。发酵罐生产黄原胶的接种量大小与种子液的质量(种子密度、活力)密切相关, 一般菌种生理状态选择在对数生长期的中后期最为适宜; 接种量为发酵液的 5%~8% (体积百分数)。

④通气: 在好气性微生物的发酵过程中, 溶氧系数是一个很重要的控制因素, 尤其在高黏度发酵体系中更为突出。搅拌速度和搅拌强度直接影响着溶解氧的密度以及发酵基质的传递。在黄原胶发酵过程中溶氧系数不但影响黄单胞菌合成黄原胶的速度, 而且影响黄原胶分子中丙酮酸和乙酸的含量及其相对分子质量的大小。当供氧充足时, 所产的黄原胶分子中丙酮酸含量高, 黏度也高; 当供氧不足时, 所产黄原胶分子质量小, 黏度也低。因此, 对属于高需氧量发酵的黄原胶生产, 需要大的通气量, 一般为 $1\sim 0.6\text{m}^3/(\text{m}^3\cdot\text{min})$ 。

⑤发酵时间: 采用分批发酵方式的黄原胶发酵中, 其培养前期为菌株对培养基的适应期和生长期, 产胶量和黏度上升缓慢。随着发酵的进行, 逐步转入产胶期, 黏度和产胶量急剧上升, 碳源被迅速利用, 糖浓度急剧下降, 在残糖达到 0.3% 以下时, 发酵结束。发酵周期的长短与生产菌种的特性、发酵培养基的组成、发酵工艺及发酵设备都有一定的相关性。早期黄原胶生产发酵周期为 72~96h, 目前国外先进的黄原胶发酵生产周期已缩短至 48~52h。因此, 从黄原胶发酵过程可知, 部分发酵参数应采用分段控制的方法以适应黄原胶的发酵生产。

黄原胶发酵包括分批发酵和连续发酵, 工业化生产黄原胶一般常用的为分批发酵工艺。发酵设备可采用传统的搅拌发酵罐, 为适应高黏度黄原胶多糖发酵, 其搅拌器的直径、搅拌桨叶、发酵罐的径高比等都有特定要求。也有采用外循环或内循环气升式发酵罐等发酵设备进行生产。

4. 黄原胶的分离、提取与纯化 黄原胶通常是以玉米淀粉辅以氮源及微量元素经微生物发酵后制得。发酵醪中除含黄原胶(3%左右)外, 还有菌丝体、未消耗完的碳水化合物、无机盐及大量的液体。其中菌丝体等固形物占 20%, 水溶性无机盐占 10%。因此要制备出食品添加用的质量合格的黄原胶产品, 需要通过下游操作技术去除菌丝体、固形物及色素等杂质以获得高纯度、高质量的黄原胶产品。下游操作主要包括浓缩、沉淀、分离、提纯等。

(1) 超滤浓缩-乙醇沉淀法。乙醇能降低多糖分子与水之间的亲和力, 在较高的醇浓度下, 使多糖分子之间相互结合凝集成沉淀。在用乙醇沉淀多糖过程中, 如果加入 Na^+ 、 K^+ 等离子, 可节约乙醇的用量。

将已发酵成熟的发酵液适当稀释, 加适量硅藻土, 快速搅拌, 用三层滤布真空吸滤, 滤液再进行膜超滤浓缩至含黄原胶 8% 以上, 加酒精沉淀, 分离沉淀, 再用酒精多次洗涤沉淀, 即得凝胶状黄原胶。在 60°C 烘干, 粉碎, 过 80 目筛即为精制黄原胶产品。

经过滤与超滤处理及乙醇沉淀得到的黄原胶产品, 可以除去大量不溶性固体悬浮物(包括菌

体细胞及细胞碎片)、可溶性无机离子、有机小分子和大部分色素物质,使产品的纯度明显提高。经此工艺处理后,最终可获得高纯度的黄原胶产品。超滤法可将发酵液浓度从原来的 2.5% 左右浓缩到 8.7%,节约了进一步纯化工序沉淀剂的用量,降低了产品的成本。

(2) 钙盐-乙醇沉淀法。在碱液条件下 ($\text{pH} > 10$),黄原胶多糖分子与 Ca^{2+} 形成钙多糖复合物,呈胶冻状沉淀;经压滤脱去约 70% 的水分,以减小体积;加入酸性乙醇处理以脱去钙多糖复合物中的钙离子,使成短絮状沉淀,再压滤除去含钙离子的滤液;用乙醇洗涤固体沉淀,然后烘干,粉碎,过筛即获得淡黄色粉末状黄原胶的工业级产品。采用此法,可使酒精溶剂的用量减少一半,但在成品中带入了钙离子,成品颜色略灰。

(3) 酶法脱蛋白-超滤浓缩法。本法使用碱性蛋白酶(也可用酸性或中性蛋白酶,或用复合酶)处理发酵液,将蛋白质水解,从而使发酵液变得澄清,不但发酵液澄清度提高,而且氮含量降低,过滤性能得到改善,在微孔过滤中过滤速度可提高 3~20 倍,成品质量也有提高。

工艺流程:

```

黄原胶发酵液
    ↓ 调 pH 9, 75℃ 水浴 30min, 巴氏灭菌
稀释发酵液
    ↓ 调 pH 至碱性, 加入适量碱性蛋白酶, 49℃ 处理 4h
酶处理发酵液
    ↓ 调 pH 5, 加适量酒精沉淀黄原胶
凝胶状黄原胶
    ↓ 加适量酒精洗涤凝胶状黄原胶, 调整 pH 至中性
凝胶状黄原胶
    ↓ 60℃ 烘干, 粉碎, 过 80 目筛
黄原胶产品
  
```

此工艺中用碱性蛋白酶处理后制得的黄原胶样品脱蛋白作用显著。经酶处理的食品级黄原胶粉剂其氮含量较未经酶处理的降低约 40%。

(4) 絮凝法。选用具有多价金属阳离子的无机盐 (Al^{3+}) 作絮凝剂,与黄原胶作用产生絮状沉淀,然后将沉淀物脱水,再用酒精等醇类作为洗提剂洗提后过滤,将滤饼干燥、粉碎、筛分后得到合格的黄原胶成品。

(5) 直接干燥法。采用滚筒干燥或喷雾干燥等方法,直接将发酵液进行干燥,从而制成工业粗制品级的黄原胶。这种方法没有分离提纯工序,所以产品成本低,但成品质量差,一般限于对黄原胶质量要求不高的场合使用。

总之,黄原胶的分离提取方法很多,但在应用上都受到各自条件、特点的制约。比较而言,采用超滤浓缩纯化发酵液的方法是比较理想的选择。如果生产工业级黄原胶,可采用酶处理-超滤浓缩法。制备食品级黄原胶,使用微滤除菌-超滤脱盐、脱水-流化床干燥工艺。此工艺的优点为:①分离提取不使用溶剂和絮凝剂,因此不需要溶剂回收装置,从而降低了生产成本;同时操作环境也得到改善,而且提高了操作安全性。②发酵液中的菌丝体、固形物和无机盐类大多被去除,因而大大提高了产品的质量,可达到食品级要求。③容易实现连续操作,减轻劳动强度。本

法的技术难点是：高浓度、高黏度的胶液对膜技术及膜材料提出了更高的要求。

(二) 黄原胶的分子结构

黄原胶是淡黄色粉末的阴离子多糖。它是由 D-葡萄糖、D-甘露糖、D-葡萄糖醛酸以 2:2:1 的分子比组成的相同单元——“五糖重复单元”聚合而成的高分子酸性杂多糖物质。分子中的每一单元还含有乙酸和丙酮酸基团，如图 3-23 所示。

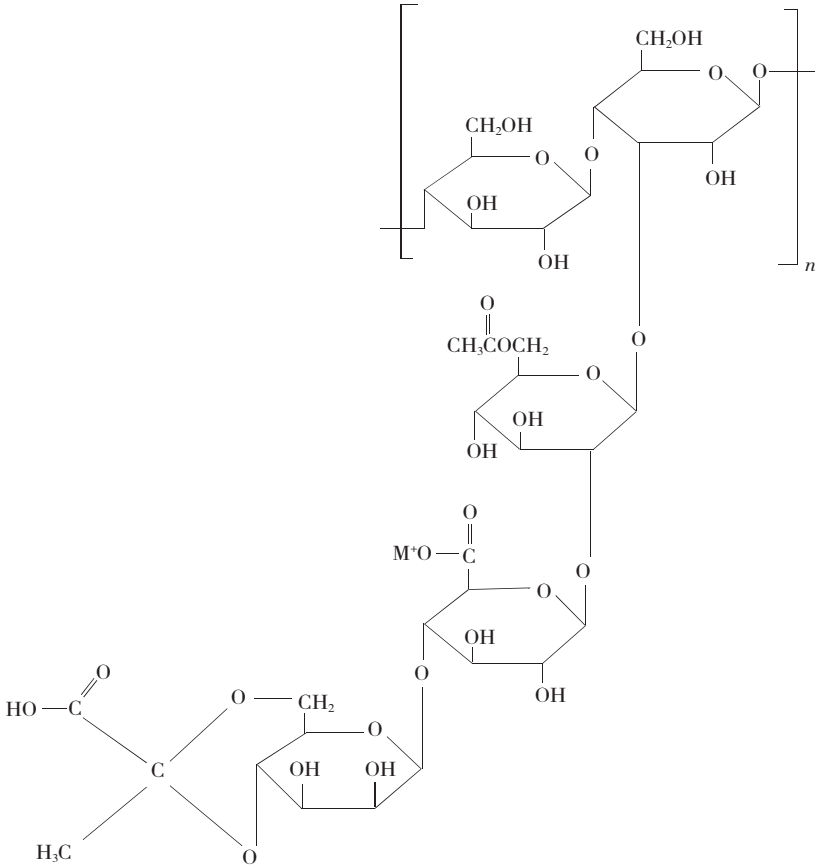
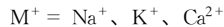


图 3-23 黄原胶分子结构



黄原胶分子主链由葡萄糖通过 β -1,4-糖苷键相连而成的 2 分子葡萄糖为单元，其结构与纤维素结构相同，因此相当于纤维素的衍生物。在主链上每隔一个葡萄糖残基的 C^3 上连有 2 分子 D-甘露糖和 1 分子 D-葡萄糖醛酸组成的三个单位长的侧链。侧链的 D-甘露糖残基有一半通过 α - (1 \rightarrow 3) 键直接与主链相连，在侧链的糖分子上连有丙酮酸及乙酸取代基，因其侧链含酸性基团，在水溶液中呈多聚阴离子，构成黄原胶的三级立体结构：带阴离子的侧链缠绕主链形成螺旋结构，分子间靠氢键形成双股螺旋，而双股螺旋结构间又是靠微弱的非共价键维系，形成规则的“超级接合带状的螺旋聚合体”。

(三) 黄原胶的性质

由于黄原胶分子是以纤维素为骨架并具有酸性侧链的双螺旋结构，可以形成网状的次级结构，并具有一、二、三级结构。在外界条件（如温度、离子强度等）的影响下，分子状态可发生变化。这种结构和状态的变化，赋予黄原胶一些特殊性能：

1. 黄原胶具有很好的溶解性、分散性、兼容性和保水性 黄原胶的强亲水性使其能在冷水和热水中迅速溶胀，形成稳定的高黏性亲水溶胶，是食品添加剂中优良的悬浮剂和乳化稳定剂；黄原胶可与绝大部分的常用食品增稠剂溶液互相溶混，特别是与藻酸盐类、淀粉、卡拉胶、角豆胶溶混后，溶液的黏度以叠加的形式增加；黄原胶对食品具有良好的保水、保鲜作用。

2. 黄原胶在低浓度时具有高黏性，抗高温和耐酸、耐碱性 黄原胶的分子质量范围为 $2 \times 10^6 \sim 15 \times 10^6$ ，溶解于水中，成为水溶性胶；含 2%~3% 黄原胶的液体，其黏度高达 $3 \sim 7 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 。在非常广的温度、pH 和盐浓度范围内，黏度几乎无变化，如黄原胶即使在 130°C 的高温下保持 30min 后冷却、在经多次冷冻-融化循环后以及在高温条件下添加少量电解质如 0.5% NaCl，胶液的黏度仍无显著变化。黄原胶水溶液的黏度几乎与 pH 无关，这一独特性质是其他增稠剂如羧甲基纤维素（CMC）等所不具备的。

黄原胶分子中的丙酮酸含量高，其溶液黏度也高。丙酮酸含量是黄原胶溶液的特性指标。黄原胶的高黏性使其具有广阔的应用前景，但同时又给生产上的后处理带来麻烦。

3. 黄原胶具有抗酶解性 黄原胶分子具有高度的生物学稳定性。黄原胶骨架由于侧链的屏蔽效应：即三糖侧链基团规则性的排列和双螺旋网状结构形成的空间障碍，阻碍酶与主链 β -1, 4-键的结合，因此对酶稳定而不被酶水解。但在较高温度下（ $45 \sim 50^\circ\text{C}$ ）和无离子存在的状态下，黄原胶分子处于无序状态，纤维素酶可以降解黄原胶。

4. 黄原胶溶液具有典型的流变特性 当胶液随着剪切速率的增加，因胶状网络遭到破坏，导致黏度降低，胶液变稀，而一旦剪切力消失，黏度又可恢复，因而使黄原胶具有良好的泵送和加工性能。利用这种特性在需要添加增稠剂的液体中加入黄原胶，不仅液体在输送过程中容易流动，而且静止后又能恢复到所需要的黏度，因此被广泛应用于饮料行业。

(四) 黄原胶在食品工业中的应用

黄原胶具有良好的增黏性、流变性和支撑固相颗粒提高悬浮能力和乳化稳定作用、耐酸碱、抗钙盐、耐高温等多方面的性能。在浓度为 0.2%~2.5% 的范围内，即可形成高黏度溶液。此溶液是明显假塑性的溶液，即具有显著的剪切变稀，这种性质在食品工业中非常有用。黄原胶与大多数食用盐类和酸类有很好的相容性，因此黄原胶在食品行业中可用作食品增稠剂、乳化剂、稳定剂、悬浮剂、泡沫增强剂等，是一种多功能食品添加剂，广泛用于饮料、焙烤食品、乳制品与调味品。

黄原胶应用于饮料、冷食、调味料、奶制品中，可作为乳化稳定剂，并可改进口感和增强风味。在橘子汁和果茶饮料中，黄原胶是最佳悬浮稳定剂，它具有使不溶物稳定悬浮和提高天然果汁混浊度的作用；在冰淇淋、冰牛奶等乳制品中用黄原胶作稳定剂；还可广泛用于蚝油、辣酱、果酱、酱油、姜汁及快餐汤料等调味品中。由于其热稳定性，在各种罐头食品中也作为悬浮剂和稳定剂使用。黄原胶-角豆胶凝胶还被用于生产以乳为主要成分的即食布

丁。这种布丁是不黏的，具有良好的口感。由于它在口中具有剪切变稀的特性，因此，放出布丁的风味。黄原胶与淀粉的混合可抑制老化，延长焙烤制品和冷冻面团的贮存期。蛋糕、面包加入黄原胶后，可使制品体积增大，孔隙均匀，富有弹性，并能延迟老化，延长蛋糕的货架寿命。

我国学者通过开展对黄原胶研制及其应用的研究，目前已有黄原胶的工业化生产规模：淀粉用量一般在 5% 左右，发酵温度 28~30℃，发酵周期 72~96h，控制 pH6.5~7.0。发酵结束时，pH 通常为 6.0，产胶能力 30~40g/L，虽然生产水平跟国外比还相对较低，但随着黄原胶生产和应用范围的进一步发展，我国的黄原胶生产将呈现一个新的局面。目前北京、四川、郑州、苏州等地都有黄原胶生产新厂建成。

二、结冷胶的发酵法生产

结冷胶 (gellan gum) 是美国 Kelco 公司于 20 世纪 80 年代初开发成功的一种新型微生物多糖，其凝胶形成能力强，透明度高，最佳的风味释放，稳定性强，不需加热或稍微加热即可形成凝胶，而且形成凝胶的温度和速度可根据需要在一定范围内变动。经过大量毒理学试验研究，1992 年 11 月美国 FDA 批准结冷胶作为食品添加剂，随后许多国家批准结冷胶用于食品工业中。

(一) 结冷胶的发酵生产

1. 菌种选育与保藏 结冷胶的原始生产菌，在 1987 年以前称为假单胞菌依落藻属微生物 (*Pseudomonosolodea*)，1987 年以后，归为少动鞘脂单胞菌 (*Sprningomonas campestris*)。结冷胶的原始生产菌产胶能力低，ATCC₃₁₄₆₁ 发酵水平仅为 0.2g/(100mL 发酵液)。Deckwer 和 Lobas 等人对 ATCC₃₁₄₆₁ 进行复筛，并提出了一种新的筛选方法，即将菌种置于以结冷胶为胶凝剂的固体培养基上，发现有部分菌落将胶凝剂消化掉而下陷，有的则不然，这两种表现不同的菌落在产胶能力方面截然相反，下陷者不产结冷胶，而不下陷者产结冷胶能力强。经研究，所筛选出的两株结冷胶生产菌 DSM₆₃₁₄ 和 DSM₆₃₁₈ 经发酵对比实验，其产胶能力提高 4~5 倍。

结冷胶生产菌的培养基，按照 kang 等人所设计的 KB 培养基 (g/L) 如下：蛋白胨 20、甘油 10、K₂HPO₄ 1.5、MgSO₄·7H₂O 1.5，pH7.2，于 121℃ 灭菌 15min。

结冷胶生产菌的保存方法可以用琼脂斜面或平板低温保藏，也可于 -20℃ 冻结保藏或真空冻干保藏，但使用前必需活化一次。

2. 发酵生产工艺流程 结冷胶发酵生产工艺流程和黄原胶发酵相近，包括种子培养、发酵产胶、发酵液预处理、沉淀分离、干燥粉碎等基本过程。结冷胶有两种产品即天然结冷胶和透明型的脱乙酰基结冷胶。

种子扩大培养→发酵产胶→发酵液预处理→沉淀分离→脱水干燥→天然结冷胶



脱乙酰处理→中和精滤→沉淀分离→脱水干燥→透明型脱乙酰结冷胶

3. 发酵培养基及其工艺控制 发酵培养基应尽可能有利于菌种发酵产胶，碳源一般采用葡萄糖或蔗糖，其配比为 3%~7%，采用二次加入的发酵方法。氮源一般采用有机氮和无机氮配

合使用,无机氮使用加入量为 0.05%~1.0%的 NH_4NO_3 ,有机氮采用加入量为 0.05%左右的酵母提取物或浓缩大豆蛋白。无机离子包括 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 、 PO_4^{3-} 等,对菌种发酵产胶有重要的影响。无机盐在发酵培养基中的加入量为: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%、 Na_2HPO_4 或 NaH_2PO_4 0.05%, MnSO_4 0.01%~0.015%, CaCl_2 0.020%~0.035%。这些无机盐在加入量适当时,能激活生产菌株中的多糖合成酶系,加速生产菌株的多糖合成速度,起到提高发酵产胶率的作用。如果加入量超过一定限度,这些无机盐离子就会和发酵液中的结冷胶作用,使发酵液黏度迅速增大,影响发酵的进行,因此,无机离子的加入量,一定要根据具体菌种和发酵工艺通过发酵实验来确定,否则可能起反作用。

结冷胶的发酵可采用一步发酵法或中间补料发酵法。通常采用后一种工艺,因为中间补料发酵工艺可以使发酵前期尽可能适应生产菌株的生长,等到生产菌株由生长对数期进入发酵产胶期后再补充碳源,一方面可缩短菌株生长时期,防止菌株过早衰老,可达到缩短发酵周期的目的;另一方面,发酵产胶期补加碳源,提高 C/N 比,有利于生产菌种发酵产胶,提高发酵液中结冷胶的含量,同时可降低分离纯化过程中溶剂的用量,降低生产成本。

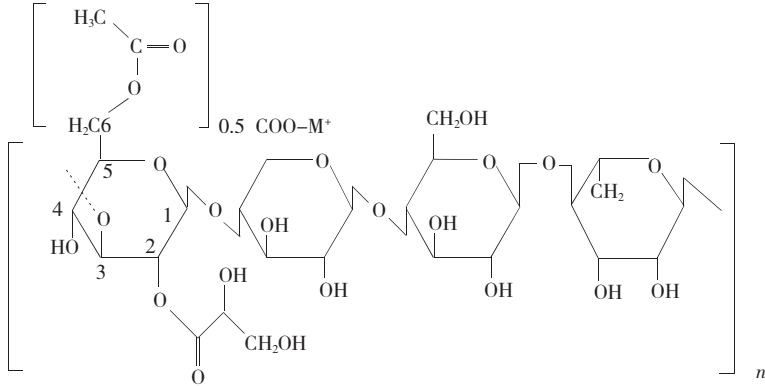
发酵条件控制:发酵前期温度 27~28℃,产胶期 30℃左右;发酵 pH 用 NaOH 或 NH_4OH 连续控制在 6.5~7.0 之间。溶解氧对发酵产胶有显著的影响,因此,在发酵过程中,尤其是发酵后期,应提高搅拌速率和强度,一方面是增加溶解氧,另一方面通过搅拌可将菌体分泌的胞外多糖尽快溶于发酵液中,防止菌体黏附缠绕在一起,阻碍菌株对营养物质的吸收利用和发酵产物的排出。从而加速发酵基质的传递,以利于提高发酵产胶率。此外,添加表面活性剂如 0.15% 的吐温,可使发酵产胶率提高 5%~10%。

4. 结冷胶的分离提取 在沉淀分离结冷胶之前,首先必须对发酵液进行预处理,主要是加热灭酶及絮凝除菌体等,这将有利于后续工序中的分离和提高产品的纯度和质量。将经预处理好的发酵液用异丙醇或乙醇沉淀分离出结冷胶,加入量为发酵液体积的 1~2 倍,再经压榨或离心法除去大部分溶剂,然后再经真空干燥或流化床造粒干燥,粉碎后包装得到高酰基结冷胶(天然结冷胶)。经预处理的发酵液在 80℃下,加入 KOH 或 NaOH 溶液并充分搅拌调 pH 至 10.0 以上,搅拌处理 10min,然后用稀 H_2SO_4 或 HCl 中和至中性,精滤除去不溶性杂质,再用异丙醇或乙醇沉淀分离出结冷胶,经干燥、粉碎包装等工序后得透明型的脱酰基结冷胶。

(二) 结冷胶分子结构及其功能特性

1. 分子结构 结冷胶产品有两种形式:一种是天然的结冷胶(也称高酰基结冷胶),另一种是低酰基结冷胶(也称脱酰基结冷胶)。它们的主体分子结构是相同的,都是由四个单糖分子通过糖苷键连接而成的重复糖单元构成的高分子糖类化合物。这四个单糖分子依次为 D-葡萄糖、D-葡萄糖醛酸、D-葡萄糖及 L-鼠李糖,其中第一个葡萄糖分子是以 β -1,4 键连接。天然结冷胶与脱酰基结冷胶在结构上的主要区别在于:天然结冷胶的每个重复单元上平均有一个酰基连接在葡萄糖分子上。酰基有两类:一类为乙酰基,以 β -1,3 键连接在葡萄糖分子的第 6 个碳原子上;另一类为甘油酰基,以 β -1,3 键连接在葡萄糖分子的第 2 个碳原子上,而且甘油酰基平均比例为乙酰基的 2 倍,而低酰基结冷胶分子结构中的酰基部分或全部被除去。两类结冷胶的分子结构重复单元如图 3-24 所示。其相对分子量约为 5×10^5 。

天然或高酰基结冷胶



低酰基结冷胶

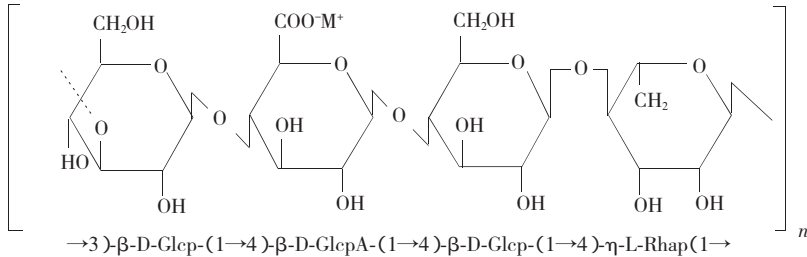


图 3-24 结冷胶分子结构的重复单元

M⁺代表一价金属离子

天然结冷胶的主链上连接有酰基，使得它所形成的凝胶柔软，富有弹性而且黏着力强，与黄原胶的性能相似。而脱酰基结冷胶由于主链上的酰基部分或全部除去，使得分子间空间阻碍作用明显减弱，易形成凝胶，并且形成的凝胶强度大、易脆裂，与卡拉胶、琼胶的凝胶特性相似。食品工业普遍使用脱酰基的结冷胶。因此，以下讨论结冷胶的特性主要是指脱酰基的结冷胶。

2. 功能特性

(1) 假塑性和流变性。结冷胶溶液是一种典型的假塑性流体，其溶液黏度随剪切速率的增加而明显降低，随剪切速率的减弱而恢复。研究表明，结冷胶溶于水后，分子之间会自动聚集，以右螺旋方式形成双股螺旋结构，螺旋间距为 2.815nm。稳定双螺旋结构的力主要为分子间氢键。双螺旋进一步聚集可形成三维网状结构。无机离子有助于稳定双螺旋结构和加速双螺旋体形成三维网状结构。因此，一定浓度的无机离子可提高结冷胶的凝胶强度。加热升温或搅拌可使三维网状结构和双螺旋体解体，故在高剪切速率作用下，三维网状结构分解为无规则的线团结构而使粘度迅速降低。当剪切速率或热作用解除时，分子结构可恢复到三维网状结构。

(2) 溶解性。结冷胶可溶于冷水或稍微加热即可溶解形成均一透明的溶液。溶解温度受水中离子种类和含量高低的影响，离子含量高，溶解温度提高。

(3) 结冷胶所形成凝胶的特性。结冷胶是一种广谱性的凝胶，其凝胶形成温度、熔化温度及

凝胶强度，可以通过加入一价或二价阳离子来调节，可以制备形成热可逆性凝胶或热不可逆性凝胶。形成凝胶的机理如图 3-25 所示。

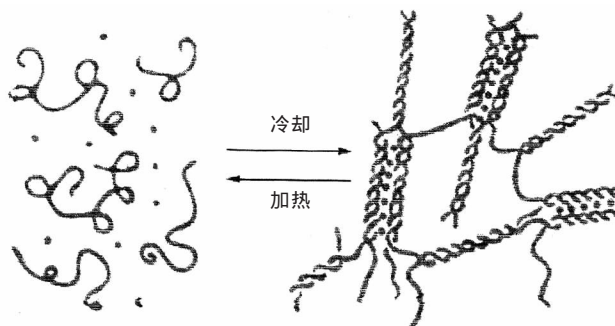


图 3-25 结冷胶形成凝胶的机理

① 阳离子的种类和浓度对结冷胶的凝胶形成起着重要作用，因为结冷胶需要盐的存在才能形成凝胶，若将结冷胶加热溶于去离子水中，冷后不能形成凝胶，即使溶于自来水中，如果水中的离子不足，也不能形成凝胶。凝胶强度并不随离子浓度的增加而不断上升，而是有一个最适浓度，并且不同阳离子的最适浓度一般是不同的，一价阳离子（如 Na^+ 、 K^+ ）最适浓度（通常为 0.1mol/L ）为二价阳离子（ Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ）的最适浓度（通常为 0.004mol/L ）25 倍左右。

② 结冷胶形成的凝胶具有显著的温度滞后性，即胶凝温度远低于凝胶融化温度。通常胶凝温度在 $20\sim 50^\circ\text{C}$ 之间，融化温度在 $65\sim 120^\circ\text{C}$ 之间。胶凝温度和融化温度的高低，可以通过凝胶形成条件（如胶浓度、阳离子的种类和浓度等）来调节。随着结冷胶浓度的增大，其胶凝温度和凝胶融化温度都随之升高，但是它们的关系并不是线性的，在低浓度条件下，浓度变化可引起这两种温度较大的变化，而在浓度较高的情况下，胶浓度变化对这两个温度影响很小。而且胶浓度的变化对结冷胶所形成的凝胶的模量、硬度、弹性和脆性都有较大的影响，浓度升高，凝胶的硬度、模量、弹性均升高，而脆性下降；凝胶的模量高，意味着所形成的凝胶结实、爽脆而不太硬，表现出良好的风味释放特性。此外，阳离子浓度和种类对结冷胶所形成凝胶的温度和融化温度有重要影响，尤其是二价阳离子。据研究报告，大多数钙型凝胶的胶凝温度为 $25\sim 40^\circ\text{C}$ ，融化温度为 $70\sim 125^\circ\text{C}$ ；而钠型凝胶的胶凝温度为 $40\sim 50^\circ\text{C}$ ，融化温度为 $75\sim 100^\circ\text{C}$ ，并且一般均随离子浓度的增加而升高。

③ 结冷胶所形成的凝胶热稳定高，耐酸、耐碱强，在 $\text{pH } 4.0\sim 8.0$ 之间几乎不受 pH 影响。而绝大多数食品的 pH 介于此 pH 范围内，因此，结冷胶应用于食品中通常不需考虑 pH 的影响。

④ 结冷胶所形成的凝胶对酶稳定，如淀粉酶、纤维素酶、果胶酶、蛋白酶、脂肪酶、褐藻酸酶等均不会对结冷胶溶液的黏度和凝胶强度造成影响。

⑤ 结冷胶的凝胶形成能力强，在相同浓度下，结冷胶强度为卡拉胶、琼胶的 $3\sim 10$ 倍，尤其在低浓度和酸性条件下使用更为有效。

⑥ 结冷胶和其他食品胶有较好的相容性。非胶凝性食品胶，如黄原胶、羧甲基纤维素、角豆胶和罗望子胶等与结冷胶混合使用，其凝胶特性相似。非凝胶性食品在其中起到填充剂的作用。凝胶性的食品胶如卡拉胶、琼胶与结冷胶混合使用，一般脆性变化不大，但是结冷胶在风味

释放、酸碱稳定性、热可逆性、热稳定性及溶解性凝胶形成能力等方面，明显优于琼脂和卡拉胶。结冷胶这些潜在的优势使得它的开发和应用具有广阔的前景。

(三) 结冷胶在食品工业中的应用

在食品加工中，结冷胶不仅作为一种胶凝剂，更重要的是可以赋予食品优良的质地和口感。通常可与多种食品胶配合使用，使产品获得最佳的产品结构和稳定性。如糖果加工中，在淀粉软糖中添加 0.075% 的结冷胶，可使凝胶形成时间由 24~48h 缩短至 12h；在果冻和果酱的制造中，用结冷胶代替海藻胶、果胶等作为胶凝剂，不仅可降低使用量 (0.2%)，而且可以形成更佳的结构和口感；在馅饼和布丁类食品加工过程中，添加适量结冷胶代替部分淀粉，可降低黏性，便于加工，而且使产品形体更加稳定，口感、外观均得到很大改善；在焙烤食品中常用结冷胶来取代琼脂制作焙烤食品，同样用量少 (0.3%)，而且产品的保水性和形体稳定性要比使用琼脂好；在乳制品生产中，结冷胶可取代卡拉胶、明胶、海藻酸钠、果胶和羧甲基纤维素，使乳制产品形成高品质的凝胶或黏稠度，而且用量少。总之，由于结冷胶具有优异的性能，使用量低且可利用微生物发酵法生产，所以结冷胶与其他食品相比，具有明显的优势。

三、茁霉多糖的发酵法生产

茁霉多糖是由真菌中的出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*) 产生的一种胞外黏性多糖，又称为短梗霉多糖、出芽短梗霉多糖和卜多糖等。出芽短梗霉为半知菌类短梗霉属，是一种具有酵母型和菌丝型形状的两型真菌。Bauer 早在 1936 年就已发现了这种多糖；后来，Bernier 等从生长在液体培养基中的出芽短梗霉发酵液中分离出该多糖；Bender 等研究并描述该菌形成胞外多糖的条件。1965 年，Wallenfels 等发现这种多糖的主要成分为麦芽三糖，次要成分为麦芽四糖。

(一) 茁霉多糖的发酵生产

1. 菌种的选育 生产茁霉多糖的微生物有出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*)，或称出芽茁霉 (*Pullularia pullulans*)、发酵茁霉 (*P. fermentans*)、发酵茁霉暗色变种 (*P. fermentans* var. *fusca*)、出芽暗色孢霉 (*Dematium pullulans*)、产气杆菌 (*Aerobacter aerogenes*) 黄金银耳 (*Tremello rneseterico*) 等。

日本和美国在 20 世纪 70 年代中期选育出多株优良菌株，如：由出芽茁霉分离选育出的 AHU₉₅₅₃；由出芽暗色孢霉分离出的 IFO₄₄₆₄；由发酵茁霉暗色变种得到的 IFO₆₄₉₁ 等。我国在这方面也进行了研究，20 世纪 80 年代中期由出芽短梗霉分离并经紫外线和亚硝基胍诱变处理，选育出产色素少，发酵周期短，转化率高的变异株 N₂₆、1126-12 等，并对其产多糖的发酵条件进行了试验，选出了适于产糖的发酵培养基成分。

2. 茁霉多糖的生产流程

培养基 → 灭菌 → 接种 → 发酵 → 加热 → 灭酶 → 絮凝除菌 → 过滤精制 → 超滤浓缩 → 干燥 → 粉碎 → 精品包装(产品)。

3. 发酵培养基及发酵条件控制

(1) 茁霉多糖发酵生产培养基组成。通常为 (g/L)：碳源 100、MgSO₄·7H₂O 0.2~0.3、FeSO₄·7H₂O 0.01、NaH₂PO₄ 2.0~3.0、酵母膏或蛋白胨 2.0~3.0、(NH₄)₂SO₄ 0.6、MgSO₄·H₂O

0.1, pH 6.5~7.5。

① 碳源：茁霉多糖发酵培养基主要以蔗糖为碳源，碳源浓度一般控制在 10%~15%，以实现其较高的合成转化率。此外，乳糖、半乳糖、甘露糖、果糖、淀粉（包括玉米淀粉、马铃薯淀粉、甘薯淀粉等）及淀粉水解产物（淀粉糖，浓度控制在 5%~15% 为宜）等，也可作为碳源。

Catley 等在研究茁霉多糖合成时，发现其合成可被葡萄糖诱导，并且蔗糖、麦芽糖、甘油、乙酸盐等也都可以作为诱导物。

② 氮源：茁霉多糖发酵常用的有机氮源为玉米浆、大豆蛋白、豆饼粉和蛋白胨等，无机氮源为硝酸盐、铵盐、尿素等。通常有机氮源和无机氮源配合使用，有利于菌体生长和多糖的合成，但氮源用量要控制适度。氮源过量会使菌体过分增殖，耗糖量大，降低茁霉多糖的产出率。

③ 无机盐：发酵培养基中需添加一定量的无机盐。常用的无机盐有磷酸钾、硫酸镁和硫酸铁等。无机盐添加适当与否会影响到茁霉多糖的产率和分子量，当培养基中磷酸盐在 0.1%~0.5% 之间，随着磷酸盐加入量的增加，茁霉多糖的产率增大，而分子量下降。添加量不宜过大，否则会影响到茁霉多糖的提取和精制。

(2) 其他条件控制。除了发酵培养基以外，发酵温度、pH、通气量、搅拌强度均会影响茁霉多糖的发酵产率和多糖的分子量。发酵培养温度 20~30℃（一般为 30℃ 左右）。适当通气搅拌，若搅拌不好，黏度过高，影响后期残糖的利用，使发酵周期延长，通气量以 1/2 罐容积为宜。pH 的控制尤为重要，通常 pH 越高，生成的多糖分子量越低，发酵液初始 pH 在 5.0~6.5 之间（通常发酵液 pH 为 6.0 左右），随着发酵液的 pH 上升，所产出的茁霉多糖分子量下降。此外，发酵培养时间和搅拌强度也会影响茁霉多糖的产率和分子量，因为在发酵培养过程中，茁霉多糖分解酶也同时生成。发酵培养周期与菌种有关，一般在 5~7d 茁霉多糖产量达到最高峰。应在最高峰前几小时终止发酵，进入除菌和分离精制工序。因为产量达到高峰值后若继续培养，茁霉多糖会被其分解酶迅速分解，得率下降，分子量也会大幅度降低。

日本林原公司于 1978 年开始工业化规模生产此种多糖。以糖蜜为主要原料，在含有机氮、无机氮及无机盐的培养基上，于 27℃ 培养 3~5d，多糖收率为 70%。

(二) 茁霉多糖的结构及其理化性质

茁霉多糖分子是由麦芽三糖单位组成的，麦芽三糖含三个 α -1,4 糖苷键连接的葡萄糖分子。麦芽三糖按 α -1,6 键重复连接成一个线状茁霉多糖大分子（其分子结构单元如图 3-26 所示）；而且构成单位并不总是麦芽三糖，在某些情况下是由 α -1,3 键合的并夹有麦芽四糖。

茁霉多糖是一种无色、无味、无臭、无毒的高分子物质。由于它是一种 α -葡萄糖苷构成的多聚葡萄糖，因而其水溶性好，且溶液呈中性，不离子化，不凝胶化，不结晶，不吸潮，不胶粘，极为稳定。茁霉多糖水溶液的黏度受到其分子量的大小、浓度、温度和 pH 等因素的影响。其分子量越大，黏度也越大，但这种影响黏度的趋势很缓慢；浓度和温度对其黏度影响较大；浓度高，黏度大，而温度高，黏度小；pH 影响则较小，尤其在 pH 4.0~6.0 之间对黏度影响很小。

粉末状态的茁霉多糖对热的反应与淀粉相同，加热不融化，100℃ 失去平衡水分，250℃ 以上迅速分解炭化。

茁霉多糖有很好的胶粘性，其水溶液对木材、纸张、纤维、玻璃、金属等有很强的胶粘性。

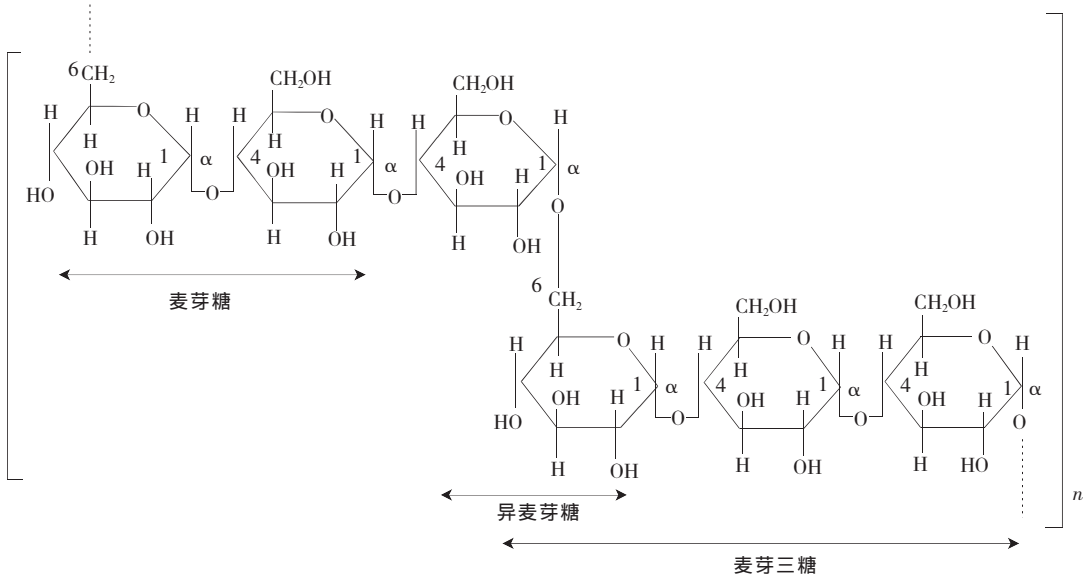


图 3-26 茁霉多糖的分子结构

茁霉多糖的可塑性强，可以制膜、纺丝，任意造型。5%~10%的茁霉多糖水溶液可制成厚度仅为0.01mm无色透明、无臭、无毒，具有良好的韧性、抗油性和抗氧气渗透性，特别适合于食品包装中使用。如果在加工中添加适量山梨糖醇、木糖醇或甘油，则可增强这种薄膜的柔软性。茁霉多糖虽然难以被消化道内的酶分解，但在自然环境中能被产生茁霉多糖酶、异淀粉酶的微生物所分解；用茁霉多糖加工而成的包装材料可自然分解，不会造成环境污染，因此是一种非常环保的绿色新型材料。

(三) 茁霉多糖在食品工业中的应用

茁霉多糖在食品工业中可用作糖果原料、食品增稠剂、农副产品的保鲜剂，还可用来制造食用薄膜（即食用包装材料）、食品品质改良剂、食品成型剂和黏结剂、食品稳定剂及抗氧化剂等。

茁霉多糖应用于糕点、面包以及米面制品生产中，可防止这些食品中的淀粉老化，延长保鲜期。茁霉多糖还是蛋和水果很好的涂膜保鲜剂，可以延长这些产品的保质期。

茁霉多糖膜具有很强的隔气性能，能很好地阻止氧气对食品的氧化作用，因此对于那些容易氧化变质的食品（如含油脂较多的肉干制品、方便面、果仁等）用茁霉多糖膜密封，或在表面喷涂后干燥，可很好地防止这些食品氧化酸败或变质。但由于茁霉多糖易溶于水，做成的膜耐水性差。因此对于含水量较大的食品，只能用茁霉多糖与其他耐水材料制成的复合膜作为包装材料。

茁霉多糖可作为许多食品的品质改良剂，例如，在肉制品中添加0.1%左右的茁霉多糖，可使肉制品的弹性、口感和持水性明显提高。在豆腐加工中，添加少量茁霉多糖可以保持大豆的香味，使豆腐的光泽、弹性好，且易于脱模。茁霉多糖具有很强的耐盐性能，因而可作为许多高盐调味料如酱油、蚝油、调味汁的稳定剂。

此外，茁霉多糖还广泛应用于医药工业、轻工业、化妆品制造业、农业、建筑业等领域。在

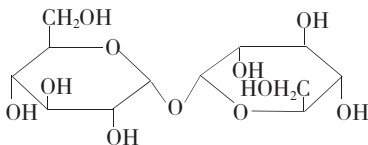
医药工业中，可代替动物胶制备粉状药物的胶囊和微胶囊，以便延长药物的保存期，控制药物的释放速度；用茁霉多糖打锭造粒可掩盖药物的苦味、刺激味等；也可将结晶性药物制成非晶体制剂，增大溶解度；还可用于制备止血剂、血浆增量剂、伤口缝合线、人工脏器等医用材料。在轻工业中，用于纺织品处理、纸加工、涂料等。在化妆品制造业中，可代替聚乙烯醇，制造护肤霜、香粉、口红油脂等皮肤保护剂。在农业中，可用于种子涂层以利机械操作；可制备颗粒肥料，以延长肥效期；也可用于农药的成型，防止用药时事故的发生。在建筑业，可用做木材胶粘剂，既省工序又节能，工业生产的价值大。

四、海藻糖的发酵法生产

海藻糖的发现可以追溯到 19 世纪。1832 年，Wiggers 首先从黑麦的麦角菌中提取了这种双糖，随后发现它在自然界的动植物和微生物中广泛存在。但是直到进入 20 世纪 90 年代，随着其独特的生物学性质及功能的发现，海藻糖才逐渐成为国际上的一大研究热点。

(一) 海藻糖的性质

海藻糖，是由两个葡萄糖分子聚合组成的双糖，分子式为 $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$ ，分子结构式为：



因其分子内不存在醛基，因而为非还原性糖，这种结构赋予海藻糖分子极强的稳定性，在 pH3.5、高温（100~120℃）下，不会产生褐变；一般的酶不能将其分解。海藻糖的甜度为砂糖的 45%，在小肠中吸收与消化。

海藻糖具有独特的生物学特性。某些物种对外界恶劣环境，如干燥、高温、冻结、高渗透压等，表现出极强的抗逆耐受力，其奥秘是它们的细胞中含有丰富的海藻糖。在上述极端严酷的条件下，海藻糖可以对生物膜、蛋白质和核酸等生物大分子发挥保护作用，从而使富含这种奇妙化合物的生命体对外界恶劣环境表现出超乎常规的抵抗力。

海藻糖不仅对生物体组织和生物大分子具有非特异性的保护作用，而且外源性的海藻糖同样对生物体和生物大分子有良好的非特异性的保护作用。目前有两种假设解释海藻糖保护生物分子的机理。一种称为“水替代”假说，它认为当生物大分子失去维持其结构和功能特性的结构水膜时，海藻糖能在生物分子的失水部位以羟基与分子形成氢键连接，形成一层保护膜，使得分子在缺水条件下仍保持其原有结构，而不丧失活性。另一种假说是“玻璃态”假说，这一假说认为通过海藻糖玻璃化转变的趋势，导致无定形连续相的形成，在结构上与玻璃状的冰相似，在这种结构中分子运动和分子变性反应非常微弱。

(二) 海藻糖的制备方法

海藻糖具有难以估量的应用前景，但其高昂价格严重限制其广泛应用。因而 20 世纪 90 年代以来，科技工作者们争相进行其生产技术的研究和开发，以降低其生产成本。目前已研发出磷酸

化酶法、微生物抽提法、发酵法等多种制备及生产方法。

磷酸化酶是以葡萄糖、蔗糖或麦芽糖等为介质，通过某些磷酸化酶的反应转变为海藻糖。1998年5月，日本食品化工公司报道，用麦芽糖磷酸化酶和海藻糖磷酸化酶催化麦芽糖液底物生产海藻糖水饴，其产品为含30%海藻糖和50%麦芽糖的液体制品。此外，日本林原生化研究所利用低聚麦芽糖基海藻糖生成酶（MTSase）和低聚麦芽糖基海藻糖水解酶（MTHase）由淀粉直接通过酶法转化生产海藻糖。

微生物抽提法是选用海藻糖含量高的酵母、霉菌、乳酸菌和其他一些真菌作为提取源。其中从酵母中提取的海藻糖在国外曾有商品供应，但制造成本过高，价格昂贵，竞争性差。

发酵法是在一定的基质上培养微生物，通过微生物发酵产生海藻糖，再从培养液中提取精制而成。我国学者李滢冰等利用真菌灰树花（*Grifola frondosa*）进行液态培养并研究海藻糖和多糖在灰树花中积累的规律：灰树花能很好利用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖及有机氮源蛋白胨、酵母粉；海藻糖累积于菌丝体快速生长期之后的稳定期，且易于提取，灰树花胞内多糖的含量也同时在稳定期达到高峰；高温法处理可提高菌丝体内海藻糖的含量，其含量可提高至灰树花菌丝体干重的15.2%。此外还有用正烷烃为碳源培养节杆菌属（*Arthrobacter*）的发酵生产，以砂糖和葡萄糖为基质培养短杆菌属（*Brevibacterium*）、棒杆菌属（*Corynebacterium*）等氨基酸发酵微生物的发酵生产，利用诺卡氏菌属（*Nocardia*）、微球菌属（*Micrococcaceae*）等微生物的培养液来制造的。

从品质、技术、资源和成本等因素来看，利用微生物发酵法生产海藻糖是发展方向，国内大连理工大学生物工程研究所、郑州轻工业学院食品与生物工程系及杭州商学院食品科学与工程系等单位在菌种选育和发酵工艺优化方面做了一些初步研究。

（三）海藻糖在食品工业中的应用

在食品工业中，因海藻糖的非还原性、保湿性、冻结和干燥抗性、优质甜味和能量供应等特性，多方面的应用正在研究和开发（表3-19）。

表 3-19 海藻糖在食品中的应用

性 质	应用举例
低甜味	糖果、口香糖、巧克力、冰激凌、糯米点心等
热酸稳定性	豆浆、茶饮料、果汁饮料、非油炸方便食品等
抗淀粉老化	糯米点心、面条等
蛋白抗变性	鱼制品、肉制品、蛋制品、乳制品和面团等
低吸湿性	脆米饼、快餐点心、营养糖、保健食品等
低呈色性	无油蛋糕、甜饼、火腿等
改良口感	冰激凌、调味料、咖啡等
保鲜	新鲜蔬菜、水果等

海藻糖用作食品添加剂或食品甜味剂，可使某些干燥食品在重新得水后仍保持原有的形状，如炒鸡蛋及果泥干燥后重新润湿，味、香、质地与新鲜食品一样。还有一些食品，如肉类、水果等在脱水前添加海藻糖能使这些食品在货架上长期存放。当这些食品在复水时，能恢复其原有的颜色、味道和组织，甚至维生素类在脱水期间也能保留。这样，完全有可能使水果和蔬菜存放的

时间大幅度延长,使之持久保持新鲜。日本林原生化研究所最近的研究发现,水果和蔬菜具有的活性氧去除能力在加工过程中会消失,而海藻糖可抑制这一现象。海藻糖在此方面的应用有待于开发。

此外,海藻糖还有其他潜在的应用领域:采用海藻糖作为干燥剂、保护剂、稳定剂,可制成具有较高活力的生化制品,如把口服小儿麻痹症疫苗与海藻糖一起干燥,在 45℃ 时其稳定性和液态 4℃ 保存条件时相当;限制性核酸内切酶、DNA 连接酶等修饰酶类,通常都要在 -80℃ 保存,而与海藻糖一起干燥,产品在 37℃ 或室温下仍具有异乎寻常的稳定性。

五、乳酸的发酵法生产

(一) 乳酸及其特性

乳酸(lactic acid)的化学名称为 α -羟基丙酸,是重要的一元羟基酸,又称 2-羟基丙酸和丙醇酸。乳酸的化学式为 $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$,分子量为 90.08。乳酸分子结构中因含有不对称碳原子,故具有旋光性。乳酸为黏稠状液体,无色,澄明,微黄色;味微酸,有较强的吸湿性;可以与水、酒精和乙醚以任意比例混合;不溶于氯仿,相对密度为 1.206。

乳酸因其存在于酸牛奶中而得名。动物肌肉中也含有乳酸,当肌肉呈疲乏状态时,乳酸量最多。乳酸还广泛存在于自然界(如腌菜、酸泡菜、酱菜、酸乳、发酵醪中),有 D-型、L-型和 DL-型三种构型。只有 L-型乳酸才能被人体完全吸收。

(二) 乳酸的发酵生产

乳酸发酵为厌氧发酵,一般采用的菌种为同型发酵的乳酸杆菌。工业规模发酵法生产乳酸始于 1881 年美国。1942 年我国汤腾汉等从牛乳中分离到乳酸菌,于 1944 年实现工业化发酵生产,成为我国发酵法生产有机酸的第一个产品。

1. 乳酸发酵微生物 Pasteur 是第一个研究乳酸发酵微生物的人。自然界可以产生乳酸的微生物很多,因为分解糖类产生乳酸对生物来说,是一种获得能量的最原始手段之一。但产乳酸能力强,能应用到工业上的只有细菌中的乳酸菌和霉菌中的根霉属(*Rhizopus*)。乳酸生产对菌种的要求是产酸迅速、副产物少、营养要求简单、耐高温。这样可以避免杂菌污染,加速发酵进程,提高生产率,便于提取。

有较高应用价值的产乳酸的细菌包括杆状菌和球状菌,分布在 5 个属中:链球菌属(*Streptococcus*)、足球菌属(*Pediococcus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)和双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)。这些细菌都是革兰氏阳性菌,不运动,无芽孢,厌氧或微好氧,发酵糖类产生乳酸。

真菌中产生乳酸的根霉属的常用菌种有米根霉(*Rhizopus oryzae*)、行走根霉(*R. stolonifer*)、小麦曲根霉(*R. ritici*)和美丽曲霉(*R. elegans*),以米根霉最重要,它可以发酵薯干、玉米等淀粉质原料,是生产 L-乳酸的良好菌种,乳酸对糖转化率达 80% 以上。

在乳酸的发酵中,凡主要产物是乳酸(对糖的转化率达 80% 以上)的菌,称为同型发酵菌,单纯生产乳酸都采用同型发酵菌。而用于生产发酵食品(如干酪、腌菜、酸泡菜等)制作用的肠膜状明串珠菌(*L. mesenteroides*)、乳链球菌(*S. lactis*)等,除产生乳酸外,还可副产挥发性

酸，称为异型发酵菌。

乳杆菌属中的德氏乳杆菌为同型发酵菌种。同型发酵中葡萄糖几乎全部生成乳酸：



而同为乳杆菌属的短乳杆菌 (*L. brevis*) 和阿拉伯糖乳杆菌 (*L. arabiacidi*) 则为异型发酵菌种。异型发酵中，发酵基质的葡萄糖生成乳酸、酒精、二氧化碳；或如双歧杆菌产生的异型发酵，其产物为乳酸和醋酸。即：



同型发酵过程：葡萄糖经糖酵解 (EMP) 途径降解为丙酮酸，丙酮酸在乳酸脱氢酶催化下，被还原型辅酶 I ($NADH + H^+$) 还原成乳酸。

异型发酵过程：大致与同型发酵相同。乙醇和醋酸的生成可能由丙酮酸形成的乙醛而来。

目前工业上用于乳酸发酵的生产菌种主要有德氏乳杆菌 (*L. delbrueckii*)、赖氏乳杆菌 (*L. leichmanni*)、保加利亚乳杆菌 (*L. bulgaricus*)。其中以德氏乳杆菌为最重要，它可发酵葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、半乳糖等，而保加利亚乳杆菌可发酵乳糖和菊粉等。

2. 乳酸发酵的原料 以糖质为原料的微生物发酵法生产的乳酸，适用于食品、饮料及医药等部门。

(1) 主要原料。主要原料是指作为主要发酵底物，用量最大的原料。能作为乳酸发酵的原料很多，但都属于糖类原料，常使用的主要原料为葡萄糖、蔗糖、糖蜜，此外还有大米、玉米、薯干、菊粉等淀粉类物质的淀粉水解糖作原料。

(2) 辅助原料。乳酸菌的生长和发酵能力的获得需要复杂的外来营养物质，必须有各种氨基酸、维生素、核苷酸等营养因子供给。在乳酸工业生产中，从经济上考虑，通常添加含有乳酸菌所需营养成分的天然廉价辅助原料为：啤酒工业麦芽制备的副产物麦根、面粉生产的副产品麸皮、大米加工的副产品米糠以及玉米浸汁浓缩液玉米浆等。

3. 乳酸发酵工艺 乳酸发酵生产用菌种为德氏乳杆菌时，由于该菌为微需氧产乳酸菌，所以可采用液体深层厌氧发酵法。目前深层发酵有两种形式：不锈钢发酵罐和水泥池深层静止液体发酵。用纯糖为原料时，其发酵工艺相当简单。但工业生产中常常为了降低成本而采用各种廉价原料，这样包括原料处理，发酵工艺就显得较为复杂。在使用淀粉质原料时，其发酵工艺还分为单行和并行两类。

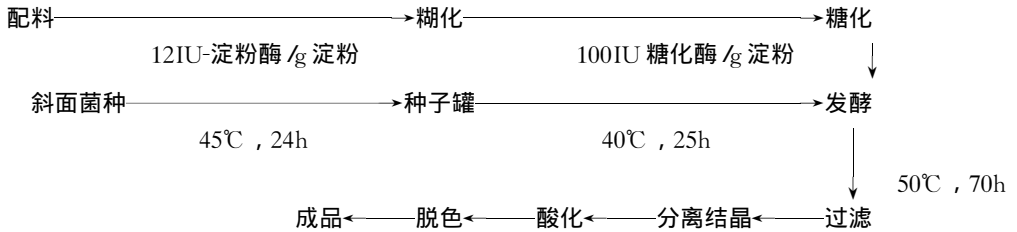
(1) 单式发酵。以糖质为原料 (如葡萄糖、蔗糖、糖蜜、淀粉水解液等)，添加辅料，接种德氏乳杆菌培养物。斜面培养基由葡萄糖、蛋白胨、酵母膏、柠檬酸铵、醋酸钠、 K_2HPO_4 、 $MgSO_4$ 、 $CaCO_3$ 等组成，pH 调至 6.5。发酵培养基以糖蜜 (淀粉水解糖或葡萄糖)、玉米浆、 $CaCO_3$ 、 $Ca(HCO_3)_2$ 为主要成分组成。保持 $50^\circ C \pm 1^\circ C$ 发酵，发酵过程中可缓慢搅拌，分批添加 $CaCO_3$ 中和产酸，使 pH 保持在 6.5 左右，5~6d 残糖降至 $2g/L$ 以下时即发酵结束。发酵完成后，用石灰乳调 pH 至 9~10，升温至 $70^\circ C$ ，然后静置 6~12h，澄清后清液放出，沉渣压滤后合并清液，再从清液中提取乳酸。

发酵生产工艺流程为：

斜面菌种→液体种子→液体扩大培养→种子罐→发酵罐→酸解罐→过滤→蒸馏→蒸发→吸附→过滤→离子交换→浓缩→成品。

(2) 单行复式发酵。以淀粉质为原料(如大米、薯干、玉米粉等)的液体深层发酵,先用麦芽(60~65℃)、曲(50℃)或酶进行糖化,糖化终了加热灭酶、灭菌,过滤并添加辅料和过剩CaCO₃,再接种德氏乳杆菌10%,50℃±1℃发酵。

发酵工艺流程：



(3) 并行复式发酵。将麸曲或糖化酶和10%乳酸菌同时接入,或用米根霉好氧发酵。利用米根霉等真菌发酵生产L-型乳酸是目前国内外大力发展的研究和生产课题。

4. 乳酸发酵新技术 近年来,用连续发酵法、固定化细胞或固定化酶发酵法及酶转化法生产乳酸的研究和报道较多,但距工业应用还有距离,还有待于进一步研究完善。

连续发酵工艺从20世纪30年代起国外就有许多人进行研究,Childs和Nelsbg用蔗糖、葡萄糖或淀粉水解糖进行了乳酸连续发酵生产,发酵温度为50℃,pH由加入石灰石粉控制,发酵培养基由9份玉米淀粉、1份大麦粉加0.25mol/L硫酸水解而成,再用CaCO₃中和,这样制成的水解糖每升含葡萄糖180g,将它过滤并稀释到总糖浓度为97g/L时,添加一定量的硫酸铵、亚硫酸钠,接种德氏乳杆菌进行发酵,一般使用混合菌株。在此连续发酵罐中,进料流速为每天置换1.5倍体积培养液,可连续操作64d。

固定化细胞和固定化酶更适合于乳酸的连续发酵,因为乳酸发酵不涉及传氧问题。Linko采用海藻酸钙固定了保加利亚乳杆菌、戊糖乳杆菌。这种方法具有操作简单、无毒性、不漏细胞、细胞固定后仍能生长等特点。

(1) 海藻酸钙包埋法。Linko等(1984年)采用海藻酸钙固定了保加利亚乳杆菌、戊糖乳杆菌和瑞士乳杆菌。方法是:将湿细胞(含干物质:保加利亚乳杆菌17%、戊糖乳杆菌29%、瑞士乳杆菌14%)悬浮在60g/L或80g/L的海藻酸钙溶液中(细胞:海藻酸根=1:5),在压力下通过内径0.6mm的空心细管滴入0.5mol/L的CaCl₂溶液中,让形成的固定化凝胶球(直径2~8mm)硬化20min,过滤。将固定化的凝胶球填充在反应柱内,间歇或连续发酵。进料中含有CaCO₃细粉作为中和剂。间歇发酵也可以自动流加NaOH中和。

用海藻酸钙固定细胞是一种温和而简便的方法,包埋后的细胞仍能生长,可以获得很好的操作稳定性。钙的螯合剂(如磷酸根)和某些阳离子(如K⁺、Mg²⁺)可使凝胶球中的结合钙溶出。而导致凝胶裂解。因此,反应体系中要加入一些钙离子(如0.005mol/L CaCl₂),可以提高凝胶的稳定性。

(2) 中空纤维固定法。中空纤维用来固定生物细胞和酶是20世纪70年代发展起来的新生物

技术。中空纤维是内径 $15\sim 50\mu\text{m}$ ，外径 $100\sim 200\mu\text{m}$ 的空心纤维，纤维壁相当于半透膜。固定时，将细胞悬浮液或酶溶液吸入纤维内，然后将两端封口即成。中空纤维反应器的突出优点是：中空纤维的比表面积很大，可以提供很大的传质面积；纤维直径小，轴向扩散距离短，可获得较高的反应速率；反应过程中生成产品自动分离，随时输出；纤维中的细胞或酶可重复纯化、回收和再生利用。

5. 乳酸的提取和精制 乳酸工业生产因原料和工艺的不同，提取工艺差别较大，但就其精制手段来说不外乎吸附、重结晶、离子交换、萃取、蒸馏等方法，其中还包括过滤和离心等分离方法。上述各种步骤都可以不同次序进行，也可以重复或交叉进行，使产品达到最终纯度和浓度。

发酵结束后首先将发酵液加热升温至 $90\sim 100^\circ\text{C}$ ，同时加石灰乳至 $\text{pH}9.5\sim 10$ ，静止后过滤除去沉淀。过滤的上清液经活性炭进行第一次净化脱色处理，同时加入 Na_2S 以除去杂质金属离子，然后在蒸发罐中于 70°C 、 56kPa 真空下将乳酸钙溶液浓缩至 37% 左右，冷却结晶成乳酸钙粗品。再加水加温使结晶溶解，在酸解槽中用 63% 硫酸酸解，过滤除去硫酸钙沉淀后的滤液经蒸发浓缩，然后再经活性炭进行第二次吸附脱色处理，活性炭脱色后的过滤溶液经过 732 阳离子交换树脂及 701 阴离子交换树脂吸附洗脱，这时滤液中乳液浓度为 8%；再蒸发浓缩至 52% 左右，真空抽滤后即可得到食用或医用级成品乳酸，最后封桶包装。

(三) 乳酸在食品加工中的应用

乳酸在食品工业中广泛用作食品和饮料的酸味剂、防腐剂、还原剂等，如合成酒、果酒、饮料酒等的酸味添加剂；还用于清凉饮料、糖果、糕点的生产和鱼、肉、蔬菜的加工和保藏。此外，罐头、甜酱、糕点、水果糖中加入适量乳酸，有柔和的酸味和浓厚感。

在酿造酱油过程中，乳酸发酵是个重要环节。乳酸菌旺盛生长，使 pH 降到酵母生长的最适值。在食醋生产中也已采用乳酸菌、酵母共同发酵的新工艺。

近年来，国外将乳酸亚铁添加到小麦粉、玉米粉、面包、饼干、奶粉等食品中，作为强化营养食品添加剂。

乳酸还有药用价值，在医药行业乳酸用作消毒和防腐剂，并且，乳酸的钙盐、铁盐都是重要的医药。

六、红曲的发酵法生产

由我国先民发明的宝贵生物资源——红曲菌种（霉）制备的红曲可广泛用于酿造、生产色素及制备保健药等方面。在我国，最初红曲的大量应用是用作酒曲。到 20 世纪 80 年代，作色素用的红曲米开始成为大宗产品。进入 90 年代以后，红曲米的应用领域拓宽，大量应用于红肠等肉制品。随着红曲深层发酵的实现，红曲红产品相继问世。

(一) 红曲的功能

1. 酿造用红曲 红曲菌中含有淀粉葡萄糖苷酶、 α -葡萄糖苷酶、红曲菌胞外酯酶，因此用于酿造生产红曲酒，酒香怡人；用红曲酿制的米醋，风味别致。

2. 天然色素红曲米与红曲红 红曲菌是目前世界上惟一生产食用色素的微生物。在中国、

日本与欧美，都有许多关于红曲色素生产的专利与研究报道。目前我国红曲色素产品，大致分为传统的红曲米产品（产于福建省古田县等地）和红曲米提取物或液体深层发酵红曲菌提取物——红曲红产品。

3. 功能性药用红曲 作药用的红曲在我国具有悠久的历史。而功能性药用红曲的现代研究却主要在近 20 年开展。已知的红曲医疗功能为：红曲菌能产生抑制胆固醇合成酶的物质 *monacolins*；红曲菌的培养物能降低动物血糖；红曲菌产生的 γ -氨基丁酸（GABA）及葡萄糖胺（*glucosamine*）有降低动物血压的作用；红曲菌可用于治疗胺血症（*ammoniemia*）；红曲具有特殊的抑菌防腐功能。红曲的医疗保健作用是红曲菌的若干代谢产物协同作用的结果。红曲为主要成分的降脂胶囊等保健品或药品已纷纷应市，呈现出良好的势头。但红曲中仍有许多生理活性物质，有待于进一步研究、开发。

4. 红曲色素的抑菌作用 1995 年，王柏琴等报道了红曲色素对肉毒梭状芽孢杆菌有抑制作用。1997 年，童群义等利用 FB-107 菌株液态深层发酵所提取的红曲色素，对其抑菌作用进行初步研究，结果为红曲色素对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌具有较强的抑制作用，对大肠杆菌及灰色链霉菌具有较弱的抑制作用，而对酵母、霉菌无抑制作用，为红曲色素用于食品防腐提供参考。

（二）红曲的制备

红曲菌有深层发酵和固体培养两种方法。在日本，先培养液体红曲种，再接种于米饭或面包培养物上，置天幕式循环通气制曲机内培养红曲，生产作色素用的红曲产品。在我国，目前的红曲米生产大多采用通气曲池进行固体培养；用作色素生产的红曲菌，经鉴定主要是 *Monascus purpureus* Went（紫色红曲菌）和 *Monascus anka* Nakazawa et Sato（红色红曲菌），都是用纯菌种培养的。

1. 红曲曲种生产

（1）试管菌种。用冰醋酸调节 12°Be' 麦芽汁或米曲汁的 pH 至 4.5~5.0，加 1.8% 琼脂，在 98kPa 灭菌 30min 后摆成试管斜面，接种生产用红曲菌，32℃ 培养 7~10d，挑选生长正常菌株备用或贮藏于 4℃ 左右冰箱中。

（2）三角瓶菌种。选择优质粳米，水浸渍后沥干，蒸熟，装瓶（50g 米饭 / 500mL 三角瓶）后 98kPa 灭菌 30min。接种试管菌液 3~4mL 于每个三角瓶中并混匀（一支斜面菌种扩接 5 瓶左右），35℃ 左右培养 7~10d 即可得到外观色泽鲜红的成熟曲种。成熟的红曲在显微镜下镜检时，应有较多近球形的子囊壳。

将培养好的曲种置 40℃ 左右烘干或在太阳下晒干，使水分在 8%~10%，用小塑料袋密封，置阴凉干燥处保存备用。

红曲菌的保藏方法，可用常规试管斜面置 4℃ 冰箱保藏，半年左右扩接一次。也可将红曲菌制成红曲米保藏，用粳米制曲后，密封置低温干燥处，2 年以至更长时间仍能保持原有菌株的活力。

（3）传统地面曲种。将三角瓶红曲种加入 2 倍量的米醋（醋酸含量在 3% 左右），或用稀释的冰醋酸溶液浸泡 4~6h 后磨浆，搅拌均匀，成为红曲醋种。按 1% 的接种量（红曲种 / 米），将红曲醋种接入蒸煮熟透的粳米中。拌匀后装入经灭菌的麻袋中。然后培曲。

将曲房彻底清洗灭菌。把袋装的曲料置曲房堆叠，室温控制在 25~35℃，以 30℃ 左右为好，并要保持湿度。培曲过程中，品温升至 45~47℃ 后，要及时将曲料从麻袋倒出摊开、定时耙动以散热并通风换气，同时要适时适量浸水以保温保湿进行曲种培养。整个培曲过程约 8d。培养成的曲种应及时 40~45℃ 烘干或太阳下晒干，然后装入内衬塑料袋的麻袋，置干燥处保存。曲种质量检查与三角瓶菌种相同，但用作生产种必须进行中试生产。情况正常方能大批量投入使用。曲种以尽早使用为妥。

地面曲种制备最好在自然温度高、品温容易控制的 7~9 月。

2. 通气曲池红曲生产

(1) 备料。原料糯米经浸渍、沥干、蒸熟及摊晾至 36~38℃。

(2) 接菌。按比例接入液状红曲种，红曲种用量为大米量的 0.5%~1%。红曲种用 2 倍量米醋（醋酸含量 3%）或相同浓度的冰醋酸浸泡 5~10h 后磨浆备用。接种拌匀后，装麻袋或直接堆码在曲房的曲池中成一堆。室温控制在 25~35℃，以 30℃ 左右为好。

(3) 曲房堆积培菌。曲料置保温的曲房培养，当最高品温升至 45~47℃ 时，要迅速拌匀曲料并运至通气曲池培养。

(4) 通气曲池培养。通气曲池如常规箱式制曲，曲料层高 25cm，用离心通气机提供风量，每池可设点接触式温度计装置自动控制制曲温度。定时人工翻料，同时定时喷水。断水后红曲菌进入后期培养，品温控制在 32~34℃，定期开关曲房的门窗以实现降温换气。通常用作色素的红曲米培养 7~8d 即可。

(5) 出曲干燥。出曲后在温度不超过 45℃ 的烘曲池中干燥，或晴天在阳光下晒干，要求红曲的含水量在 12% 以下。成品曲装袋入库。

(三) 红曲的应用前景

红曲菌种是一宝贵的生物资源。在酿造、制备保健药及生产色素方面，所用的红曲菌株性能各有不同，其培养条件也往往不同。如培养酿酒用的红曲以糖化酶活力为最重要的指标，一般制曲只需培养 4d。而作保健药用的红曲以其次生代谢产物（monacolins 等）为主要的目标产物，其培养温度要低些，培养时间常常在 10d 以上。作为食品或功能性药用红曲，在培养过程中应防止或减少可能出现的有毒的代谢产物如橘霉素，并需在菌种选育及相应培养条件等诸方面多做工作。

在红曲色素上，日本的产品有红曲红、红曲黄；已开发具有耐酸、耐盐性的红曲色素；对红曲色素进行改性，开发若干色素的衍生品；并大力开展红曲色素的应用研究等。我国台湾在 20 世纪 60 年代末就着手红曲生产改良、功能性红曲及菌种选育等方面的研究工作。

今后，在红曲菌种的选育（常规的、原生质体融合、基因重组等）、先进的生产工艺与科学管理、红曲菌系列产品的研究开发等方面均大有文章可做。

七、发酵法生产类胡萝卜素

类胡萝卜素（carotenoid）是一类具有预防血管硬化、抑制肿瘤发生、增加宿主免疫力、抗氧化和抑制自由基产生等功能的物质，并且是广泛分布于植物界的一大类重要天然色素，主要包括

β -胡萝卜素、虾青素、叶黄素和番茄红素等。

类胡萝卜素是 1813 年因首先从胡萝卜中抽提出来而得名。类胡萝卜素的化学结构特点,就是具有大量的共轭双键,属多烯色素。形成发色的基础,是一种黄、橙、红至深红色的脂溶性色素。

(一) β -胡萝卜素

β -胡萝卜素 (β -carotene) 属类胡萝卜素色素的一种,是维生素 A 元或维生素 A 前体物质,是共轭多烯烃化合物,易溶于石油醚,难溶或不溶于醇。 β -胡萝卜素广泛存在于植物、藻类和真菌中;而动物、人体自身不能合成,因此只能靠高等植物或微生物提供。从植物胡萝卜、番茄等富含 β -胡萝卜素的天然果蔬中提取,工艺复杂,着色力差;从盐藻中提取天然类胡萝卜素也受地域条件、原料来源、提取得率等限制,生产成本较高。从 20 世纪 80 年代起,发现盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*) 含有丰富的 β -胡萝卜素,在以色列、澳大利亚等国已进入工业化生产阶段,生产能力 $10\text{mg}/\text{m}^2\cdot\text{d}$;但此法受到外界环境制约,需要强烈光照,海水含盐分要在 10% 以上。 β -胡萝卜素作为一种具有增色和营养双重功效的食品添加剂,在食品加工中正引起越来越多的重视,利用微生物发酵技术生产天然类胡萝卜素工艺,其安全性、低成本及强着色力等优势在国内外受到格外的青睐。目前国内外主要看好三孢布拉霉 (*Blakeslea trispora*) 和红酵母 (*Rhodotorula*),前者已处于产业化开发研究阶段,后者尚处于实验室小试研究阶段。

1990 年,巴西 Nattell 等人用甘蔗汁发酵培养红酵母 (*Rhodotorula glutinis*),20h 振荡培养,生成 β -胡萝卜素 $2.5\text{mg}/\text{g}$ (干细胞)。我国张素琴等研究采用分枝杆菌菌种 Cr-1 (*Mycobacterium* sp.) 在最适条件下发酵 6d,生成 β -胡萝卜素 $280\text{mg}/\text{L}$ 。由真菌发酵生产 β -胡萝卜素主要有两种菌株,一是布拉克须霉菌 (*Phycomyces blakeskeamii*),生成 β -胡萝卜素 $2.6\text{mg}/\text{L}$,二是丝状真菌三孢布拉霉菌 (*Blakeslea trispora*),产 β -胡萝卜素 $0.8\text{g}/\text{L}$ 。第二种菌种是实现工业化生产的菌种。目前,国际上实验室水平生产 β -胡萝卜素已达到 $3\sim 3.5\text{g}/\text{L}$ 。

β -胡萝卜素作为食品添加剂,是一种具有营养强化作用的重要着色剂。在食品中添加 β -胡萝卜素能使食品色泽金灿灿。作为有效的着色剂,尤以油质食品为限。添加 $1\sim 10\text{mg}/\text{kg}$ 于人造奶油、鲜奶油及其他食用油脂的食品中,就能获得满意的着色效果。

此外,由于 β -胡萝卜素具有刺激免疫、降血脂、预防心血管疾病等功能,在医疗保健方面有广阔应用前景。1992 年, β -胡萝卜素的功能饮料在日本是最畅销的饮料,其中,森永乳业生产的含量为 12% 的胡萝卜素汁每 200mL 售价 130 日元。在化妆品行业中, β -胡萝卜素作为天然色素添加到口红、胭脂中去,既着色又起抗氧化作用。

(二) 虾青素

虾青素 (astaxanthin),即 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基- β , β' 胡萝卜素,在动物体内,尤其是海洋水生动物如虾、蟹及动物的羽毛中广泛存在。虾青素是一种类胡萝卜素,为脂溶性,具有艳丽的红色和显著的抗氧化性能,可延缓衰老,预防肿瘤,因此开发虾青素具有广阔的市场。红发夫酵母因高产虾青素,且营养要求简单,培养周期短,菌体可综合利用,发酵过程易于产业化,是国外生产虾青素的主要菌种。目前,我国学者对培养红发夫酵母生产虾青素的研究主要集中在高产菌种选育及发酵条件优化、提高虾青素产量和降低成本、廉价培养基的开发利用等方

面。

在虾青素高产菌种选育方面，有研究表明：经抗霉素 A 诱变及 benomyl（苯菌灵）和 EMs 诱变可以得到高产虾青素的红发夫酵母突变菌株。我国学者以诱变育种技术和原生质体融合技术筛选得到目前国内虾青素产量最高的突变株 y-20-2。其第十代摇瓶结果：总色素含量为 1.876mg/g 干重，总色素产量为 42.16mg/L，总色素产量下降率仅 13%。

裘娟萍等对红发夫酵母的生物学特性研究表明：红发夫酵母细胞产虾青素需要大量氧气；葡萄糖和蔗糖是最佳碳源，酵母膏与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 复合物为最佳氮源；在低温下红发夫酵母生长减慢，有利于色素合成；最适生长 pH 为 6.0，而色素形成的最适 pH 为 5.0。虾青素是胞内脂溶性物质，并且是次级代谢产物，菌体生长会抑制虾青素的合成，解除磷对次级代谢的抑制，有利于虾青素的高产。Johnson 等人研究红发夫酵母生产虾青素的最佳条件发现，纤维二糖为虾青素积累的最佳碳源，酵母膏浓度从 0.1mg/mL 增加到 10mg/mL 时，虾青素的产量从 156 $\mu\text{g/g}$ 增加到 524 $\mu\text{g/g}$ 干重；pH 5.0 最适合生长和积累虾青素；在 6% 葡萄糖的培养基中，生物量、胞内虾青素含量及虾青素产量分别为 16g/L、0.3mg/g 及 5mg/L。Haard 等人采用糖蜜代替葡萄糖为碳源，获得的虾青素产量为 15mg/L。Yamane 等研究了氧和葡萄糖对 *Phaffia rhodozyma* 酵母初级代谢和虾青素合成的影响，在限氧或高葡萄糖浓度的条件下，虾青素的产生速率显著下降，而在有氧条件下时，虾青素的产量随供氧的增加而增加；高的初始 C/N 比有利于虾青素产量的提高，但高糖抑制酵母的生长。他们还通过计算分析，得出了虾青素产量的提高可通过降低厌氧代谢所需的 NADPH 的量来实现，提出依靠使用高的 C/N 比来提高虾青素产量。在此基础上研究了两步分批流加法，即先通过低的 C/N 比来强化细胞的生长，后通过流加高 C/N 比的基质来强化虾青素的合成，最终培养液中虾青素产量达到了 16mg/L。

生产虾青素的原料，当使用廉价的首蓿液培养红发夫酵母，可有效地增加细胞的繁殖量，但不利于虾青素的产生。而以乳清超滤液，纤维素的酶水解物，以谷物为原料的燃料乙醇蒸馏物，过滤的甘蔗汁、尿素和磷酸钠等培养红发夫酵母，能提高虾青素产量，显示了以粗原料及三废来培养红发夫酵母生产虾青素的潜力。

虾青素的着色功能和生理功能，使其应用十分广泛。在食品上，既可着色又可有效地起到保鲜、防止变色、变味、变质的作用。含虾青素的红色油剂既可用于蔬菜、海带和水果的腌渍，用于饮料、面条、调料的着色也有专利报道。虾青素的抗光敏作用较 β -胡萝卜素更强，国外有含虾青素的化妆品专利，制药及食品工业利用虾青素的抗氧化作用、抗炎症作用及免疫促进作用来作为药物预防氧化性组织损伤和配制保健食品。同时由于虾青素有艳丽红色，并可与肌动蛋白非特异结合，将其加入水产饲料中，可以改善养殖鱼类的皮肤和肌肉色泽，增加鱼类的抗病能力。

虽然利用红发夫酵母生产虾青素获得了一系列的可喜进展，但与其他成熟的发酵产品来比，利用红发夫酵母生产虾青素仍是产量低，发酵成本高，因而大规模商业化生产并不普遍。当前除了继续在高产菌株筛选、优化培养条件、降低发酵成本、提高产量等方面深入研究外，还有必要运用基因工程技术，将合成虾青素的关键酶基因多拷贝转入红发夫酵母中，并能有效地进行代谢调控，实现虾青素的高效表达，克服传统技术难以解决的问题，满足迅速发展的市场对虾青素及其制品的巨大需求。

第十节 发酵工程与食品废弃物的处理

在以农、牧、渔业产品为主要原料进行的食品加工业中，会在各个生产环节产生大量的副产物及废弃物。同时，由于食品加工业需水量很大，废水排放量也很大。在这些废弃物与废水中蕴藏着丰富的可再生资源和能源，如果能及时有效地进行回收处理并利用起来，将产生不可估量的经济、社会与环境效益。否则不但造成浪费，而且还会严重污染环境，危害人们的身体健康，破坏生态平衡，有悖于可持续发展的战略国策。本节主要介绍发酵工程在食品工业废水等废弃物处理中的应用。

一、食品工业废水分类及特性

(一) 分类

按与饮食有关的食物工业中产品的生产原料不同，可将食品工业分为：①粮食加工工业；②淀粉工业；③含酒精饮料工业；④无酒精饮料工业；⑤制糖工业；⑥水果、蔬菜加工工业；⑦鱼与鱼制品工业；⑧肉与肉制品工业；⑨禽蛋加工工业；⑩乳与乳制品工业；⑪食用油脂工业；⑫调味料及添加剂工业等。

在食品加工过程中，约有30%~50%的原料成为副产物和废弃物。例如每吨淀粉需用玉米1.7~1.9t；每吨酒精需用粮食3~3.3t；制糖工业，生产每吨食糖需用甜菜或甘蔗9~10t；每吨味精需用淀粉3~4t等等。随着食品工业产量的增加，消耗的农产品量也增加，同时产生的副产物和废弃物的量也增加。这些副产物大多可作为农田肥料，有的则是富含营养物质的饲料，如果合理利用，可节约资源并促进农副业的发展。如果不加利用或利用不好，就将成为主要的环境污染源。

食品加工业中用水量很大，废水排放量也很大。例如，每吨酒精耗水200t；生产每吨糖耗水150t；每吨啤酒耗水35t；每吨罐头耗水100t；每吨味精耗水1000t；每吨饮料耗水100t等等。

(二) 特性

由于食品工业的原料广泛，制品的种类繁多，排出的废水质量差异也大。其主要特性为：废水中可生物降解成分多，对一般的食品工业，由于原料来源于自然界有机物质，其废水中的成分也以自然有机物质为主（如蛋白质、脂肪、糖、淀粉），不含有毒物质，故生物降解性好。废水中含各种微生物（包括致病微生物），使废水易腐败发臭。高浓度废水多，其BOD值在500mg/L以上的情况很多，因此从节约水资源和降低成本的观点出发，在有机物质不变而水量减少，和增加有机物质而水量不增加的情况下，都会导致废水浓度增高。废水中氮和磷含量高的情况多，在肉类、豆类 and 动物胶加工时，从蛋白质中产生氮；在水产品加工时，在鱼糕等精制品制作，火腿和腊肠的制作时，都使废水中的氮和磷增高。

(三) 水质污染度指标

表征废水污染程度的水质指标，可概括为物理指标、化学指标和生物指标。物理指标主要有总固体、悬浮物、浊度、色度等等。化学指标主要有生物需氧量（BOD）、化学需氧量（COD）、

总有机碳、总需氧量、有机氮、氨态氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮、总氮、溶解氧、pH、有机化学毒物、无机化学毒物等。生物指标主要有细菌总数、大肠菌群、病原菌和病毒等。其中几个主要指标如下。

1. 废水的理化指标

(1) 悬浮物 (SS)。水样经过滤, 将截流物蒸干后的残余固体量称为悬浮物, 这是表示水中固体物质含量的一项重要水质污染指标。

(2) 生物需氧量 (BOD)。在温度、时间一定的条件下, 微生物氧化分解水中有机物的过程中, 所消耗的溶解氧数量, 称为生物化学需氧量, 简称生物需氧量, 单位为 mg/L 。它可以间接地反映出有机物的含量。BOD 值越高, 表示水中有机物含量越多。

由于微生物氧化分解有机物的速度与温度有关, 所以 BOD 测定的标准温度规定为 20°C 。

通常的测定方法是: 用预先为溶解氧饱和的稀释用水, 适当稀释被检测水样, 接种微生物, 充满特制的测定瓶, 加塞密封, 于 20°C 静置培养一定时间 (一般 5d), 测定培养前后的溶解氧量之差, 由此计算出 1mL 被检测水样消耗的氧的微克数, 即被检测水样的 BOD_5 。

(3) 化学需氧量 (COD)。COD 表示当利用化学氧化剂氧化废水中的有机物时, 以氧化有机物质所消耗的氧化剂相当的氧量来间接表示水中有机物的含量, 单位为 mg/L 。废水的 COD 值越高, 表明水中有机物含量越多。目前常用的氧化剂是重铬酸钾。化学需氧量测定可将大部分有机物氧化, 并且也包括了水中所存在的还原性无机物质。

(4) pH。表示水的酸碱性质。

(5) 含氮有机化合物。氮是有机物中除了碳以外的一种主要元素, 在废水中的氮素有四种: 有机氮、氨态氮、亚硝酸盐氮和硝酸盐氮。水中存在氨态氮, 则表示水中的有机氮正在分解。氨态氮如果很高, 则表示不久前曾受过严重污染。其中游离氨 (NH_3) 对水生物来说是一种有毒物质, 为了保护水生物, 一般认为水体中 $\text{NH}_3 \leq 0.2\text{mg/L}$ 是必要的。

(6) 含磷化合物。在废水中, 含磷化合物分有机与无机的两大类。有机磷化合物如葡萄糖-6-磷酸、1-磷酸甘油酸、磷肌酸等。有机磷化合物大多呈胶体和颗粒状, 可溶性的只占 30% 左右。无机磷化合物主要是一些可溶性的磷酸盐。目前常用钼钼酸铵比色法 (或称钼蓝比色法) 测总磷量作为测磷的指标。

在废水生物处理中, 碳、氮、磷营养素的合理配比, 是促进微生物正常发育, 维持正常运转的重要条件。因此, 了解废水中的含磷化合物量, 对废水生物处理是十分重要的。食品工业的有些废水中缺少磷营养源, 需要加以补充。一般来说, 水体的总磷浓度应控制在 0.1mg/L 以内, 以免引起水体的富营养化, 危害水产资源。

2. 废水的生物指标 废水所含的生物污染物质一般是通过细菌总数和大肠菌群数这两个水质指标来度量的。

(1) 细菌总数。细菌总数作为水质指标的度量值, 以细菌个数 1mL 废水计。它的测定是将定量水样接种于营养琼脂培养基中, 在 37°C 温度下培养 24h 后, 计数生长细菌菌落数, 然后根据接种的水样数量, 算出 1mL 水样中的菌落数, 即得细菌总数值。废水的水样中含细菌的总菌落数量, 说明水质的有机污染程度。

(2) 大肠菌群数。大肠菌群数是水质细菌检验的常用指标, 以大肠菌群数 1L 水样来表示。

大肠菌群的测定方法目前常用发酵法和滤膜法。大肠菌群一般包括大肠埃希氏杆菌、产气杆菌和副大肠杆菌，主要寄生在人和动物的肠道中，大量地存在于粪便中，废水中若检出大肠菌群，说明它已遭到粪便的污染。但以其作为水质卫生检验指标，只能间接反映出水中可能存在肠道病原菌，不能反映出水中是否有传染性病毒以及除肠道病原菌以外的其他病原菌。对此，应另行研究，采用专门的检验方法。

食品工业废水本身无毒性，但含有大量可降解的有机物质，废水不经处理排入自然水体要消耗水中大量的溶解氧，造成水体缺氧，使鱼类和水生生物死亡。废水中的悬浮物沉入河底，在厌氧条件下分解，产生臭气，恶化水质，污染环境。若将废水引入农田进行灌溉，会污染农产品，并污染地下水源。废水中夹带的动物排泄物，含有虫卵和致病菌，将导致疾病的传播，直接危害人畜健康。因此，食品工业废水必须进行处理。

二、食品工业废水的处理方法

食品工业废水的处理方法按作用原理可分为物理法、化学法和生物法三类。

(一) 物理法

用于食品工业废水处理的物理法有筛滤、撇除、调节、沉淀、气浮、离心分离、过滤、微滤等。前五种工艺多用于预处理或一级处理，后三种主要用于深度处理。

1. 筛滤 筛滤是从废水中分离出较粗的分散性悬浮固体物的预处理中使用最广泛的一种方法。
2. 撇除 用于除去某些食品工业废水中含有的油脂。
3. 调节 对于水质水量变化幅度大的食品工业废水，常设置调节池对废水的水质和水量进行调节，调节池容量为日处理废水量的 15%~50%。
4. 沉淀 沉淀是用来除去原废水中无机固体物和有机固体物，以及分离生物处理工艺中的固相和液相。
5. 气浮 气浮主要用于除去食品工业废水中的乳化油、表面活性物质和其他悬浮固体。

(二) 化学法

中和法、氧化还原法（投加氧化剂、电解、光氧化等）、混凝法、离子交换法、膜分离法（电渗析法、反渗透法等）都属于化学处理法。

食品工业废水处理中所用的化学处理工艺主要是混凝法。混凝法不能单独使用，必须与物理处理工艺的沉淀法、澄清法或气浮法结合使用，构成混凝沉淀或混凝气浮，混凝沉淀可作为生物处理的预处理，也可作为生物处理后的深度处理。常用的混凝剂有石灰、硫酸铝、三氯化铁、聚合氯化铝、聚合硫酸铁以及有机高分子混凝剂（如聚丙烯酰胺），但这种有机高分子混凝剂经常作为助凝剂。化学处理工艺主要除去水中的细微悬浮物和胶体杂质。

(三) 生物法

目前食品工业废水的处理方法主要是以微生物处理为主，辅之以物理和化学的方法。

1. 微生物处理废水的必要条件 在适当的营养源和环境条件下，微生物能快速生长繁殖，在微生物摄入有机物构成自身新生菌体成分的同时，还将大量有机物分解成 CO_2 和水。含有机物

的废水一般含有微生物生长所必需的碳源，但要消耗这些碳源，必须和氮、磷、钾等营养保持适当的平衡。为了使微生物生长并呈现活性，还须满足温度、pH、溶解氧浓度等环境条件。因此，用微生物处理废水，多数情况是由许多微生物形成混合培养体系，其生物群随废水的种类而异。只要满足①废水成分营养的平衡调节，②环境条件的调节，③驯养适应的微生物群这三个必要条件，就可以使有机物的分解速度比自然的微生物分解作用提高数倍或数十倍。

2. 生物处理工艺 食品工业废水的生物处理工艺可分为：好氧工艺、厌氧工艺、稳定塘、土地处理以及由上述工艺的结合而形成的各种各样的组合工艺。食品工业废水是有机废水，生物法是主要的二级处理工艺，目的在于降低 COD、BOD₅。

(1) 好氧生物处理工艺。好氧生物处理工艺根据所利用的微生物的生长形式分为活性污泥工艺和膜法工艺。前者包括传统活性污泥法、阶段曝气法、生物吸附法等。后者包括生物滤池、生物转盘、活性生物滤池 (ABF) 等。一般好氧处理对低浓度废水 (COD < 1 000 mg/L, BOD₅ < 500 mg/L) 效果较好。

① 曝气活性污泥工艺：向食品加工废水中不断地充入空气 (即曝气)，使水中有足够的溶解氧，为好氧微生物生长繁殖创造良好的条件，经过一定时间后，就会产生一种褐色絮状泥粒，其中含有大量的微生物，这种充满微生物的絮状泥粒，就叫做活性污泥。活性污泥主要是由菌胶团细菌、原生动物和后生动物所组成的微生物群体。此外，还含有一些无机物、分解中的有机物和微生物自身代谢残留物。活性污泥中除细菌外，还有毛霉、根霉、曲霉、青霉、镰刀霉等霉菌，以及各种原生动物类，它们对活性污泥的正常活动会有某种帮助。

活性污泥结构松散，表面积很大，具有很强的吸附和氧化分解有机物的能力。如果条件适当，活性污泥还具有良好的自身凝聚沉淀性能。这种以活性污泥为主体的废水处理方法就称为活性污泥法。目前，活性污泥法已成为处理有机废水的主要方法。

采用活性污泥工艺处理食品工业废水的有机负荷不能太高，一般范围在 0.01 ~ 0.5 kg BOD / (kg MLVSS · d) 之间 (MLVSS 表示活性污泥浓度)，混合液悬浮的浓度保持在 2 500 mg/L，运行正常的活性污泥系统中 BOD 去除率一般为 75% ~ 95%。去除率受废水的性质、负荷量、活性污泥量、活性污泥驯化程度、混合方式、反应时间和温度等的影响。如果有机负荷过高，同时又缺乏氧，则会出现膨化现象，即凝块膨润难于沉降，使沉降槽中污泥与上清液的分离非常困难。

在活性污泥处理中，把预先培养好的活性污泥投入曝气池，废水中的有机物质就被活性污泥氧化分解。曝气池中活性污泥是废水的 1/2 ~ 1/5。曝气时间为 4 ~ 6h。曝气后的污泥混合液被送至沉淀池。在沉淀池停留 2 ~ 3h 后，使污泥沉淀，分离出来的澄清水作为净化水而排放。沉淀的污泥收集后排出，把其中一部分污泥送回曝气池循环使用。残余的污泥可经脱水干燥处理，并用甲烷发酵，这种剩余污泥被浓缩，送入发酵槽进行消化分解。

② 膜法工艺：常用的活性污泥法，是把活性污泥保持在悬浮状态的悬浮式活性污泥池。最近，出现在曝气池中设置填料作为生物膜的载体，利用生物膜的作用，或生物膜和悬浮式活性污泥联合作用达到净化污水的目的，这就是所谓的固定性活性污泥法，也称淹没式生物滤池或接触曝气池。生物转盘，也可以视为固定性活性污泥法的一种，采用生物转盘处理食品工业废水时，有机物除去率与单位盘面负荷有关，单位盘面负荷愈低，处理效率愈高。膜法工艺处理的食品废

水其有机负荷可以较高，如果采用两级串联生物滤池，其第一级能处理的水力负荷可达 $8 \sim 40 \text{ m}^3 / (\text{m}^2 \cdot \text{d})$ ，有机负荷为 $0.4 \sim 4.8 \text{ kg BOD} / (\text{m}^3 \cdot \text{d})$ ；第二级处理的水力负荷可达 $1 \sim 4 \text{ m}^3 / (\text{m}^2 \cdot \text{d})$ ，有机负荷为 $0.08 \sim 0.40 \text{ kg BOD} / (\text{m}^3 \cdot \text{d})$ 。

把活性生物滤池 (ABF) 与活性污泥法两种工艺相串联，用二沉池污泥回送到滤池进水中的方法处理高浓度的食品工业废水，不仅可防止活性污泥的膨胀，并且能承受冲击负荷。活性生物滤池的水力负荷可达 $60 \sim 120 \text{ m}^3 / (\text{m}^2 \cdot \text{d})$ ，有机负荷达 $2.4 \sim 4.8 \text{ kg BOD} / (\text{m}^3 \cdot \text{d})$ 。

(2) 厌氧生物处理工艺。厌氧生物处理工艺适用于食品工业废水，主要原因是废水中含有易生物降解的高浓度有机物，且无毒性。厌氧生物处理法已经实际应用的是甲烷发酵法，它是密闭静置发酵，动力消耗低，产生的甲烷 (沼气的主要成分) 可作为能源，生成的剩余污泥量少，并且厌氧处理系统全部密闭，利于改善环境卫生。

甲烷发酵中有机物的分解分两阶段进行。第一阶段又叫做液化过程，即废水中的可溶性及悬浮性有机物主要被梭状芽孢杆菌、芽孢杆菌、变形杆菌、假单胞菌、链球菌、埃希氏杆菌等嫌气性细菌作用，大部分分解成低级脂肪酸。第二阶段也叫气化过程，这时各种甲烷细菌如甲烷球菌、甲烷八叠球菌、甲烷杆菌等将低级脂肪酸同化分解成甲烷和 CO_2 。甲烷发酵所消耗的有机物中的能量，约有 80% 转入甲烷中得到回收。这里需要特别注意的是不要破坏跟发酵过程有关的微生物的平衡。

甲烷发酵分 $36 \sim 38^\circ\text{C}$ 的中温发酵和 $51 \sim 53^\circ\text{C}$ 的高温发酵两种，在一定容量发酵槽中产生的气体量，后者可以是前者的 2~4 倍。因此，对于在高温下得到的废水，或者在能够燃烧所产生的气体作为加热用热源的情况下，采用高温发酵较为有利。甲烷发酵废水处理流程如图 3-27 所示。

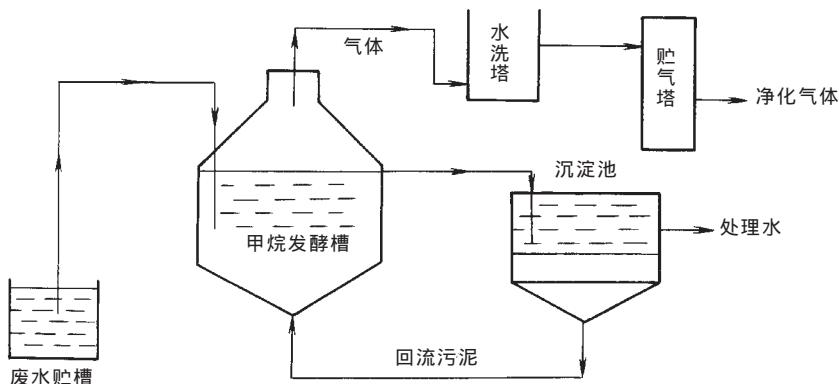


图 3-27 甲烷发酵废水处理流程示意图

甲烷发酵这种厌氧生物处理是一项具有经济效益和环境效益的处理技术。但该方法分解废水中有机物的速度慢，需要大体积的处理槽，BOD 的去除率低于好气处理法，厌氧生物处理后的出水达不到直接排入水体的要求，因而多用于好氧处理工艺的前处理，或者作为排放到城市下水道之前的预处理。

厌氧生物处理工艺也可分为厌氧活性污泥法和厌氧生物膜法。前者包括厌氧接触消化法、上

流式厌氧污泥床 (UASB) 等。后者有厌氧生物滤池、厌氧生物转盘、厌氧流化床等。

① 厌氧接触消化法：厌氧接触消化法是对传统消化池的一种改进。是将消化池溢出的混合液脱除溶解气体，经沉淀池分离固体物，再将沉淀池的污泥回流消化池。由于增加了污泥的停留时间，因而提高了厌氧消化池的负荷能力和处理效率。

② 上流式厌氧污泥床 (UASB)：UASB 是一种高效厌氧反应装置。具有结构紧凑、简单、无需搅拌装置、负荷能力高、污泥颗粒化、处理效果好、操作管理简便等优点。图 3-28 是 UASB 的结构示意图。其设计关键是布水系统、气液固三相分离器和集水系统的设计。

③ 厌氧滤池 (AF)：厌氧滤池属于生物膜法，由于填料上附着大量的厌氧微生物，因而负荷能力较高，具有结构简单、耐冲击负荷、操作简便的优点，但容易堵塞。

(3) 稳定塘工艺。稳定塘工艺可分为好氧塘、兼性塘、厌氧塘、曝气塘和生物塘（包括养鱼塘、人工植物塘等）。一般厌氧塘、兼氧塘和好氧塘串联使用。从建造和运行角度而言是最经济的一种处理工艺，处理效果一般是令人满意的，只是有些气味，且占地较多。

我国南方地区有利用肉联废水进养鱼塘养鱼的例子，投配负荷为 $22.5\text{kg BOD}_5 / (\text{hm}^2 \cdot \text{d})$ ，每 5 天投配一次。进水 BOD_5 为 798mg/L ，出水 BOD_5 为 15mg/L ，除去效率达 98%。实践表明，采用屠宰废水养鱼，只要利用得当，可使鱼增产 5~10 倍左右，且所产鱼合乎食用要求。利用藕塘净化屠宰废水平均每 667m^2 产鲜藕 2 000kg，比清水藕塘约增产一倍。

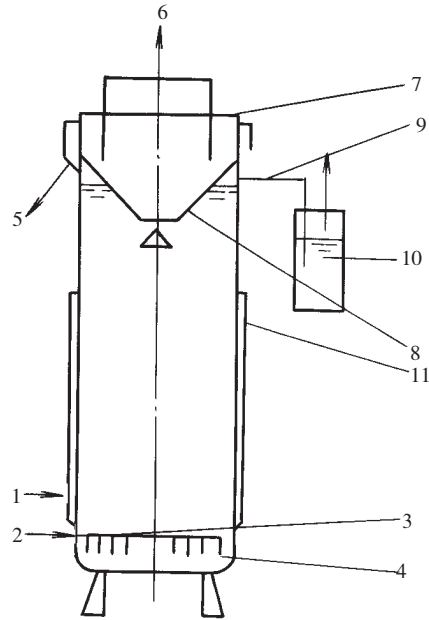


图 3-28 UASB 结构示意图

1. 热水进口 2. 进料 3. 环形布水器 4. 喷嘴 5. 排水口 6. 排气口 7. 溢流 8. 三相分离器 9. 出气口 10. 水封 11. 热水出口

三、食品工业废水生物处理的应用

(一) 高浓度食品工业废水生产单细胞蛋白

食品工业废水大多属高浓度有机废水，如酒厂、味精厂、淀粉厂、豆制品厂、制糖厂、柠檬酸厂的废水的浓度都很高，用常规的生化处理往往需要先稀释多倍后才能进行，这既增加基建投资和占地面积，也浪费大量的水。因此，可以用高浓度食品工业废水培养酵母及白地霉等制备单细胞蛋白作为饲料，不仅合理利用了资源，化害为利，而且能大大减轻环境污染，可谓一举两得。

酵母是一类真菌，在无氧条件下只能利用葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、半乳糖和棉子糖。

在有氧的情况下,可利用糖、醇、醛和各种有机酸作为碳源,不同属和种的酵母利用各种底物的能力不一样。糖化酵母、油脂酵母和许旺酵母(*Schwanniomyces*)能利用废水中淀粉;而汉逊酵母、毕赤酵母、酵母族酵母、拟内孢霉(*Endomycopsis*)、德巴利酵母(*Debaryomyces*)、假丝酵母等属,除能利用六碳糖、五碳糖、糖醇和多种寡糖外,其中假丝酵母(*Candida* AS₅₀)还能利用菊粉糖和纤维素;毕赤酵母(*Piniakazanvae*) LKB₃₃₅专以淀粉为惟一碳源。以毕赤酵母等菌来处理 COD 为 400~6 000mg/L 的有机废水,通气培养后废水 COD 的去除率达 90% 以上。但是,当培养 pH 低于 4.0 或处理温度降至 10℃ 时,废水处理的效果就大为降低。如用酿酒废水来培养酵母,应控制 BOD:N:P 为 100:1:0.2,要是废水中氮、磷量不足,可添加尿素和磷酸盐。利用汉逊酵母 SPKL-S 来处理 COD 为 1 500mg/L 的鱼肉加工废水(含 1.5% 蛋白质和 0.1%~1.0% 脂质),经 30h 培养,COD 的去除率可达 50%。这种酵母菌中蛋白酶和氨基酸氧化酶的活性很强,可把分解蛋白质所产生的氨基酸再经脱氨生成的酮酸作为碳源来利用。用酿酒酵母变种(*Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*) yS-1 处理 COD 为 1 400mg/L 的马铃薯榨液,其 COD 的去除率可达 75.5%,固形物培养的得率为 1.75%,其中酵母的生成量为 0.39%。此酵母含维生素 B₂582mg/L、丁酸 309mg/L,是一种优良的饲料。

上海市环境科学研究院使用酵母 By-0721 对上海油脂二厂废水进行处理,其处理后 COD 从 15 000mg/L 降至 400mg/L,干酵母的得率为 0.6%~0.7%,其中粗蛋白含量为 42.3%。美国 R. Braun 利用柠檬酸生产的废水来培养酵母(*Candida varliouaarai*),废水 COD 约下降 60%~65%,干酵母得率为 0.35%~0.40%。英国用 7L 的发酵罐来处理该废水,通气培养 5h 后,COD 去除率达 90% 以上。华南理工大学用热带假丝酵母 2837 处理广州食品厂的柠檬酸废水,在 30L 自吸式反应器通气 20h,其 COD 去除率达 66.5%。

江苏如东县丰利油米厂采用连续流加法以味精生产废水来培养热带假丝酵母,年生产饲料酵母达 150t,废水 COD 可下降 70%,酵母的营养成分与鱼粉相当,生产酵母成本每吨约为 1 300 元。

Hayman 等人分别用生产燃料酒精的副产物 70% 釜馏物(thin stillage, TS),10%~15% 玉米谷蛋白饲料(corn gluten feed, CGF)和 6%~8% 浓缩玉米酒糟废液(corn condensed distillers solubles, CCDS)加入到发酵培养基中培养红发夫酵母,其生长速度快,发酵周期短,这三种副产物都能积累最大生物量,且酵母中含有丰富的蛋白质、脂类和维生素及虾青素,可以直接作为饲料添加剂。

上海市豆制品行业中的大多数工厂均以黄油水来培养白地霉,由于白地霉生产工艺较为简单、操作简便、生成的菌体较大、分离时可以不用高速离心机等特点,因此生产成本相应降低。上海市豆制品行业的工厂培养的白地霉的收率约为 0.5%,如添加糖蜜则得率平均在 0.7%~0.8%,回收白地霉后的废水比黄油水的 COD 约下降 50%。也有一些工厂用黄油水流加糖蜜和营养盐来生产食用酵母,生产工艺大致相同,而酵母价值倍增,但作为食用级酵母的销售还仍有争议。

用有机废水来培养单细胞蛋白(SCP),既能使污水得到初步治理,又能回收可观的 SCP,这些菌体蛋白中含有丰富的蛋白质和多量的脂肪、糖、无机盐及各种维生素。不同的 SCP 中各种氨基酸组分见表 3-20。

表 3-20 几种 SCP 中氨基酸的百分含量

氨基酸	啤酒酵母	白地霉	假单孢菌	全蛋
赖氨酸	7.7	7.8	5.4	6.5
苏氨酸	4.8	5.4	4.6	5.2
蛋氨酸	1.7	1.6	1.8	3.2
胱氨酸	—	2.9	0.3	2.4
色氨酸	1.0	1.3	—	1.6
异亮氨酸	4.6	5.3	3.9	6.7
亮氨酸	7.0	7.8	7.0	8.9
缬氨酸	5.3	5.8	5.9	7.3
苯丙氨酸	4.1	4.8	4.2	5.8

这些 SCP 除了能作为抗菌素和各种工业发酵制品的培养基外，还是一种价值较高的高蛋白补充饲料。目前 SCP 占世界所产蛋白质总量的 3%~5%，大部分作饲料添加剂。因为 SCP 内核酸含量较高，一般达 8%~25%，人体摄入后由于核酸中鸟嘌呤和腺嘌呤经代谢后形成不易溶解的尿酸，导致人类肾结石和痛风症等疾病。联合国蛋白质咨询小组建议人体核酸最大摄入量为 2g/d，儿童减半。但是，对大多数动物则不会形成尿酸，摄入体内的核酸往往代谢成可溶性的尿素而排出体外。

(二) 淀粉工业废水的生物处理

淀粉工业是以玉米、马铃薯、小麦、大米等农产品为原料生产淀粉或淀粉深加工产品（淀粉糖、葡萄糖、淀粉衍生物等）的工业。淀粉工业约需 1.7t 原料才能得到 1t 产品，在生产过程中，需水量很大，废水排放量也大，而且废水都是含大量淀粉、蛋白质、糖类、脂肪、纤维素等有机物的高浓度有机废水。

用玉米为原料生产淀粉的工艺用水量很大，一般为 5~13m³/t 玉米，玉米淀粉废水中 COD 值为 8 000~30 000mg/L，BOD₅ 值为 5 000~20 000mg/L，SS（固体悬浮物）值为 3 000~5 000mg/L，pH 4~6，呈酸性。近年来，在淀粉废水厌氧处理中，除了应用厌氧接触法、厌氧填料床、厌氧滤池等工艺外，发展最快应用最多的是上流式厌氧污泥床（UASB）工艺。

上流式厌氧污泥床（UASB）用于废水处理已有 20 多年的历史，其特点是利用微生物群体本身的凝聚性能，在厌氧反应器内形成颗粒化污泥，保持高浓度微生物量，并以高速甲烷发酵的形式处理淀粉中的有机物。这种废水处理方法由于具有能耗低、剩余污泥量少等优点，20 世纪 80 年代由欧美发达国家开发，到 90 年代已经普及世界各地。

北京红星淀粉厂是以玉米为原料年产淀粉为 6 000~7 000t 的中型企业，其生产废水主要来源于气浮槽排水、淀粉洗涤水和玉米浸泡水，还有少量地面冲洗水。水质的 COD 为 7 000mg/L，BOD₅ 为 4 000mg/L，pH 为 4~5，SS 为 500~1 000mg/L，总氮为 30~120mg/L，温度为 20~25℃。

该厂采用厌氧与好氧相结合的工艺来处理玉米淀粉废水，并选择投资较低，容积负荷高，处理效果好的常温 UASB 反应器为该工艺的主体构筑物。它的主要工艺参数为：停留时间 20h；容积负荷 8.4kgCOD/(m³·d)；有效容积 420 m³（14m×6m×5m）；产沼气量 700 m³/d（沼气纯度 50%~60% 甲烷）；COD 去除率大于 75%。

处理工艺流程为：废水→调节罐→厌氧处理器（沼气脱硫→储气罐→沼气利用，底泥→浓缩池→污泥脱水→污泥外运）→曝气池→沉淀池（污泥部分回流至曝气池，部分送入浓缩池处理）→接触氧化池→二次沉淀池（污泥部分回流至曝气池，部分送入浓缩池处理）→出水。

在运行过程中，有以下几个因素影响 UASB 处理效果。

①悬浮固体物，废水中 SS 对厌氧过程有很大影响，应先经预沉池去除。因为淀粉废水中如果含有玉米粒等固体悬浮物，这些不易生物降解的 SS 进入 UASB 反应器，会形成浮渣或占据一部分有效容积，并会导致颗粒污泥的解体，使悬浮物质与厌氧微生物混合，将厌氧微生物挤出厌氧反应器，从而降低厌氧污泥的活性与反应器中的活性厌氧污泥含量，严重时浮渣还会结成硬壳，在三相分离器内阻碍沼气的释放和收集，甚至会阻塞沼气管路。

②营养，良好的营养条件是产甲烷菌和有关菌群代谢、生长的前提，淀粉废水中含有丰富的营养物质，基本上不需加营养物。

③温度，调试期间，废水先在调节池中加热到 30℃ 左右，再次进入 UASB 反应器，确保反应器温度维持在 20~25℃。在正常运行时，温度的变化对 UASB 的运行影响不大。

（三）啤酒生产废水的生物处理

啤酒工业废水的性质和一般生活污水的性质比较接近，含有大量可被生物利用的有机物。因此，治理的方法多采用微生物处理法，可采用好氧生物，也可先采用厌氧生物处理，降低污染负荷，再用好氧生物处理达标后排放。

1. 啤酒工业废水的生物处理方法 目前，国内外处理啤酒工业废水的主要方法有：活性污泥法、生物转盘法、厌氧生物法等。

（1）活性污泥法。啤酒工业废水是较高浓度的有机废水， BOD_5/COD 一般在 0.5 以上，可生化性很好，用活性污泥法进行处理速度较快，有机物去除率高，但因废水的 BOD_5 值高，要达到较高水平的溶解氧，以防止污泥膨胀，因此曝气能耗运转费用高。

（2）生物转盘法。生物转盘是表面附有生物膜的盘片（通常为圆形或多边形），通过水平轴，安装在装有废水的氧化池中，盘片大约有一半浸于废水水面之下，盘片在水平轴的带动下缓慢转动。浸于水面下的盘片上的生物膜会吸附废水中的有机物，而当这部分盘片转出水面时，生物膜吸收大气中的氧，使吸附的有机物在好氧微生物的作用下得到氧化分解。生物转盘法一般不易发生污泥膨胀现象，其抗负荷变化的能力强于活性污泥法。

生物转盘法处理啤酒废水主要用在我国南方的小型啤酒厂。

其主要工艺流程：废水→滤池→曝气池→一沉池→生物转盘→二沉池→出水。

（3）厌氧生物法。啤酒生产废水中的制麦车间、发酵车间、酿造车间所排放的高浓度有机废水若直接进入混合废水，将会使混合废水的有机物浓度大大增加，造成处理成本增加，处理变得困难。如实行清污分流，高浓度废水采用厌氧生物法处理后再进入好氧处理单元，可以降低处理成本，回收能源，而且有利于好氧处理单元的稳定运行。常用的也是 UASB 法，还有 IC（内循环反应器）法、AAFEB（厌氧附着膨胀床）法等。

啤酒废水也可采用土地处理，由于啤酒污水中的污染物为大麦、大米、啤酒花的糟粕及其分解物，是对作物生长有利的营养成分。污水首先进入沉淀池，经沉淀、混合、中和及曝气后进入缓冲贮水池调节水质水量，再引入种藕的土地处理场，使污水进一步得到净化，经过莲藕的生物

净化作用，出水水质可达到农田灌溉水质标准，直接用于农田灌溉，该处理工艺用于商丘啤酒厂污水处理，得到较好的处理效果，并为周围农田灌溉提供了水源。

2. 啤酒废水处理工程实例

(1) 吸附生物降解法 (AB 法) 处理啤酒废水。徐州某啤酒厂年产啤酒 3 万 t，废水量 1 650 m³/d，废水主要来源于糖化、发酵、洗瓶等工序，各个工序产生的废水水量及水质变化都较大，其主要组成为粗蛋白、淀粉、葡萄糖及其他糖类物质，混合废水的主要水质指标：pH 为 7.86 (范围 6.84~9.72)，COD 为 1 720 mg/L (范围 782~3 610 mg/L)，BOD₅ 为 1 020 mg/L (范围 437~1 930 mg/L)，SS 为 963 mg/L (范围 218~2 740 mg/L)。采用吸附降解工艺 (AB 法) 处理，1998 年建成投入运行。处理的流程为：啤酒废水→集水井→格栅→调节池→A 池 (鼓风机曝气，加入回流污泥)→中间沉淀池 (污泥注入污泥回流井)→B 池 (鼓风机曝气)→二沉池 (污泥进入排泥井)→出水。污泥→回流污泥井 (回流污泥进入 A 池)→排泥井→污泥消化池 (鼓风机曝气，风量 13 m³/min)→污泥浓缩池 (HRT=24h，加入 3% 有机絮凝剂聚丙烯酰胺，上清液进入集水井)→脱水机 (清液进入集水井)→堆泥棚→干污泥。

采用吸附生物降解法进行啤酒废水的处理，其效果良好，废水处理设施运行结果：pH 7.72，COD 50.4 mg/L，BOD₅ 81 mg/L，SS 57 mg/L。该工艺具有如下特点：

① 该工艺耐冲击负荷强，出水水质稳定，对啤酒发酵洗涤水的瞬间排放或洗涤水 pH 的短时波动有很强的抗冲击能力，即使吸附反应池中微生物失活，也能在数小时内迅速复活，并保证接触氧化池出水水质稳定达标。

② A 段对磷和氮的去除率优于传统一段法的初沉池，改善了 B 段消化过程的工艺条件，提高了消化效果，有利于吸附段除去部分氮和磷，进一步提高了出水水质。

③ A 段的污水停留时间较短，去除单位 BOD₅ 的费用相当低，不到普通活性污泥的一半，基建投资比普通活性污泥法低一半。

④ 运行以来，未发现污泥膨胀现象，说明 AB 法对这一传统活泥法存在的难题有所克服。

⑤ 主要曝气装置采用微孔曝气器，提高了氧的利用率，减少了鼓风机的配制量，有很好的节能效果。

(2) 序批式活性污泥法 (SBR 法) 处理啤酒废水。江苏扬州啤酒厂年产啤酒 50 000 t，该厂总水量为 2 000 t/d，生产废水主要来自麦芽车间、糖化工段、灌装工段及其他废水等。全厂混合废水的主要水质指标：pH 为 6.0~8.0，COD 为 800~2 000 mg/L，BOD₅ 为 600~1 500 mg/L，SS 为 350~1 200 mg/L。设计值：COD 为 1 500 mg/L，BOD₅ 为 1 000 mg/L。

针对啤酒生产废水间歇排放，水质水量波动大的特点，采用 SBR 法处理工艺，限制曝气方式。主体工艺流程：啤酒废水→粗格栅→集水井→细格栅→水解调节池→曝气沉淀池→排放；水解调节池与曝气沉淀池中的污泥经：集泥池→潜污泵→污泥浓缩池→污泥反应池→污泥泵→厢式压滤机→泥饼外运。

处理效果：经过一年多的连续运行，SBR 处理工艺的运行结果如下：pH 为 7~8，COD 为 50~90 mg/L，BOD₅ 为 20~30 mg/L，SS 为 50~72 mg/L。

(四) 柠檬酸废水 UASB 的处理工艺

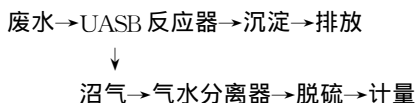
柠檬酸生产废水主要来自各生产工序 (原料处理、发酵、提取、精制等) 的废液以及地面冲

洗水和设备管道等的清洗消毒废水，每生产 1t 产品约产生 7.5m^3 废水，高时可达 $10\sim 15\text{m}^3$ 。以常州味精厂柠檬酸生产车间为例，该车间年产柠檬酸约 2 000t，每日排出废水 100m^3 。

柠檬酸废水有机污染负荷极高，处理难度大，废水主要污染成分为柠檬酸生产过程的发酵中间产物（主要为各种有机酸）及生产菌体所分泌的酶，发酵残留物、葡萄糖、氨氮、蛋白质、脂肪及无机盐、有机酸盐等

柠檬酸废水中各污染物浓度大致如下： $\text{COD } 15\,000\sim 30\,000\text{mg/L}$ ， $\text{BOD}_5 11\,000\sim 20\,000\text{mg/L}$ ， $\text{TN } 500\sim 520\text{mg/L}$ ， $\text{pH } 3.8\sim 4.8$ ，色度高，水温 $40\sim 50^\circ\text{C}$ 。

我国已成功地研究和应用 UASB 法治理柠檬酸废水。曹国良等研究了柠檬酸废水的 UASB 治理工艺，所设计的实验流程为：



实验装置如图 3-29 所示。

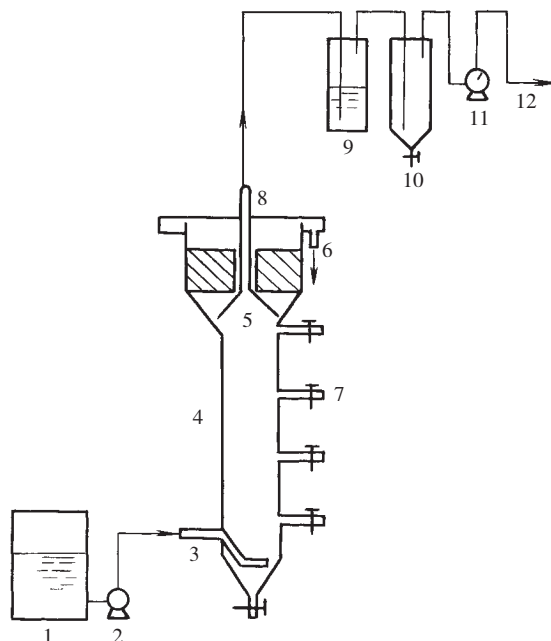


图 3-29 UASB 法处理柠檬酸废水试验装置示意

1. 试验废水 2. 进料泵 3. 进料口 4. 反应床 5. 三相分离部分 6. 出水口
7. 取样口 8. 出气口 9. 气水分离器 10. 脱硫 11. 气体计量表 12. 排空

实验所用废水取自柠檬酸生产厂，废水水质如下： COD 为 $13\,000\sim 20\,000\text{mg/L}$ ， BOD_5 为 $5\,000\sim 7\,000\text{mg/L}$ ， $\text{pH } 4.6\sim 5$ ， SS 为 $3\,150\text{mg/L}$ ， NH_3 为 15mg/L ， TN 为 516mg/L ， TP 为 3.5mg/L 。

采用低负荷渐增方式启动装置。污泥采自豆制品厂废水厌氧反应器内的厌氧颗粒污泥，污泥性质： TSS 为 19.6g/L ， VSS 为 9.2g/L ， $\text{pH } 7$ ，温度为 $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。将污泥放入反应器中，加入

适量 COD 2 000mg/L 左右的试验废水, 控制反应器内温度为 $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 调节 pH 至 7 左右, 静止 1d。然后小流量低负荷 ($0.2 \sim 0.4\text{kgCOD}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$) 连续进水 (HRT 约 4d), 根据出水 COD 的变化情况逐步增大流量和有机负荷。由于污泥已经颗粒化, 所以驯化时间较短。经过约 30d 的培养和驯化, 系统基本稳定, 可以投入运行。

处理结果表明, 当 UASB 的 HRT 为 24h, 温度 35°C , 容积负荷为 $14\text{kgCOD}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$, 进水 pH 为 5 时, 废水 COD 由进水 $13\ 100\text{mg}/\text{L}$ 降为出水的 $1\ 558\text{mg}/\text{L}$, 去除率在 86% 以上; BOD_5 由进水的 $6\ 800\text{mg}/\text{L}$ 降为出水的 $540\text{mg}/\text{L}$, 平均去除率可达 92%。pH 由 5 升至 7.2, 每去除 1kgCOD 产气 0.45m^3 。当容积有机负荷下降时, 处理效果更好。

主要参考文献

- [1] [美] 丹尼尔等著. 华侨大学化学化工系生物工程教研室译. 发酵与酶工艺学. 福建: 福建科学技术出版社, 1983
- [2] 杨汝德著. 现代工业微生物学. 广州: 华南理工大学出版社, 2001
- [3] 管敦仪著. 啤酒工业手册 (下册). 北京: 轻工业出版社, 1985
- [4] 熊宗贵著. 发酵工艺原理. 北京: 中国医药科技出版社, 2000
- [5] 俞俊棠, 唐孝宣著. 生物工艺学. 上海: 华东化工学院出版社, 1991
- [6] 华南工学院, 大连轻工业学院, 天津轻工业学院, 无锡轻工业学院著. 发酵工程与设备. 北京: 轻工业出版社, 1981
- [7] 顾其丰著. 生物化工原理. 上海: 上海科学技术出版社, 1997
- [8] 郭继烈, 郭庆华著. 新型发酵蛋白饲料. 北京: 科学技术文献出版社, 1996
- [9] 无锡轻工大学编. 微生物学. 北京: 中国轻工业出版社, 1990
- [10] 姚汝华著. 微生物工程工艺原理. 广州: 华南理工大学出版社, 1996
- [11] 刘英俊, 汪金追著. 微生物应用工业. 台北: 中央图书出版社, 民国六十六年
- [12] 李艳著. 发酵工业概论. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- [13] 高孔荣著. 发酵设备. 北京: 中国轻工业出版社, 1991
- [14] 戚以政, 汪叔雄著. 生化反应动力学与反应器. 北京: 化学工业出版社, 1999
- [15] Peter F, Stanbury et al. Principles of Fermentation Technology. Pergaman Press, 1984
- [16] Harvey W, Blanch et al. Foundation of Biochemical Engineering——Kinetics and Thermodynamics in Biological Systems. American Chemical Society, 1983
- [17] J. R. Leigh. Modelling and Control of Fermentation Process. Peter Poregrius Ltd, 1987
- [18] 日本发酵工学会编. 微生物工学——基础应用. 产业图书, 昭和 58 年 5 月
- [19] 骄岛癸年编著. 微生物的发酵生产. 共立出版株式会社, 昭和 54 年三月
- [20] Jean De Clerck. A Text book of Brewing. Vol. one. London Chapman 8Hall Ltd, 1957
- [21] W. P. K. Findley. Modern Brewing Technology. The Macmillan Press, 1971
- [22] A. H. Cook, Barley and Malt. New York and London: Academic Press, 1962
- [23] Yishan Lin. Am. Soc. Brewing Chemists. Fall, 1974, 69
- [24] S. W. Wolzahn. Am. Soc. Brewing Chemists. Spring, 1977, 54
- [25] J. H. Linton. Brewers Digest, Nov, 1973, 42

- [26] L. J. Souster. *The Brewer*. December, 1995, 493~497
- [27] Lucien Howlett. *Process Engineering*. July, 1995, 36~37
- [28] Ingev Russel. *Brewers Guardian*. Nov, 1997, 34~38
- [29] B. Rickards. *The Brewer*. March. 1994, 109~112
- [30] 尤新主编. 功能性发酵食品. 北京: 中国轻工业出版社, 2000
- [31] 高福成. 新型发酵食品. 北京: 中国轻工业出版社, 1998
- [32] 许周善, 周晓燕. 冬虫夏草多糖的研究进展. *工业微生物*. 2000, 30 (1): 56~57
- [33] 李华钟等. 谷胱甘肽的生物合成. *中国医药工业杂志*. 2000, 31 (5): 236~239
- [34] 王正刚等. 酵母天然酶系生物合成谷胱甘肽. *生物技术*. 2001, 11 (1): 13~15
- [35] 施碧红, 黄建忠, 施巧琴, 吴松刚. 啤酒酵母变株 M-05 合成谷胱甘肽的研究 (II) 发酵条件的研究. *福建师范大学学报 (自然科学版)*. 2000, 16 (4): 74~78
- [36] 赵旭东, 魏东芝, 俞俊棠. 固定化酵母细胞生物合成谷胱甘肽的研究. *华东理工大学学报*. 2000, 26 (1): 29~32
- [37] 吴坚平, 林建平, 刘慧敏, 岑沛霖. 培养条件对产朊假丝酵母合成谷胱甘肽的影响. *化学反应工程与工艺*. 2001, 17 (1): 89~93
- [38] 李寅, 陈坚, 周楠迪, 傅为民, 阮文权, 伦世仪. 环境条件及摇瓶补糖策略对谷胱甘肽发酵的影响. *生物工程学报*. 1998, 14 (2): 147~152
- [39] 李寅, 陈坚, 毛英鹰, 伦世仪. 重组大肠杆菌生产谷胱甘肽发酵条件的研究. *微生物学报*. 1999, 39 (4): 355~361
- [40] 吴琼等. 乳链球菌肽高产菌株发酵条件的研究. *工业微生物*. 2000, 30 (1): 36~39
- [41] 李植峰等. 拉曼被孢霉 F_5 发酵生产 γ -亚麻酸的研究. *氨基酸和生物资源*. 2001, 23 (3): 17~20
- [42] 潘冰峰等. 利用海洋微藻生产富含 DHA 的单细胞油脂. *生物工程进展*. 2000, 20 (6): 43~45
- [43] 彭志英主编. 食品生物技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- [44] 尹光琳等. 发酵工业大全. 北京: 中国医药科技出版社, 1992
- [45] 李滢冰等. 海藻糖在灰树花深层发酵中的积累及多糖的提取. *食品与发酵工业*. 2000, 26 (2): 11~15
- [46] 章银良等. 产海藻糖酿酒酵母培养基优化及生理学研究. *生物技术*. 2001, 11 (6): 27~30
- [47] 程池. 天然生物保存物质——海藻糖的特性和应用. *食品与发酵工业*. 1996, 1: 59~6
- [48] 罗明典. 微生物生产海藻糖及其应用前景. *微生物学通报*. 1996, 23 (4): 252~254
- [49] 唐传核等. 海藻糖及其应用. *食品研究与开发*. 1998, 12 (4): 15~17
- [50] 王柏琴等. 红曲色素、乳酸链球菌素、山梨酸钾对肉毒梭状芽孢杆菌的抑制研究. *食品与发酵工业*. 1995, (6): 29~32
- [51] 董群义等. 红曲色素抑菌作用研究. *食品工业科技*. 1997 (5): 5~6
- [52] 傅亮等. 红曲色素高产菌株发酵特性的研究. *食品科学*, 1996 (3): 6~9
- [53] 王岁楼. 红酵母类胡萝卜素高产菌株的筛选及其发酵生理学条件研究. *工业微生物*. 2001, 31 (1): 19~22
- [54] 王菊芳等. 红发夫酵母生产虾青素进展. *生物工程进展*. 2000, 20 (5): 48~50
- [55] 裘娟萍等. 虾青素高产菌种的选育. *工业微生物*. 2001, 31 (2): 5~8
- [56] 裘娟萍等. 红发夫酵母的生物学特性. *工业微生物*. 2001, 31 (3): 6~8
- [57] Ohnson E A *et al* . *Johnson of General Microbiology*. 1979, 115 : 173~183
- [58] Haard N F *et al* . *Biotechnology Letter*. 1988, 10 : 609~614
- [59] 刘子贻等. *中国海洋药物*. 1997, (3): 46~49
- [60] 张素琴等. *食品与发酵工业*. 1989, 14 (5): 1~5
- [61] 唐受印等. 食品工业废水处理. 北京: 化学工业出版社, 2001

第四章

酶工程原理及其在食品中的应用

第一节 酶工程原理和方法

一、酶工程概述

酶是来自于生物细胞的具有催化功能的特殊蛋白质，它的催化特点是具有高效性和专一性，而且具有反应条件温和、反应产物容易纯化等优点。利用酶进行化学反应，所需的能耗低，污染少，操作简单，易于人工控制，它与需要高温高压、强酸强碱等传统的化学反应相比，具有强大的发展优势。因此通过几十年的发展，酶工程行业已经有了举足轻重的工业地位。酶工程是利用酶所特有的生物催化性能，将酶学理论与化工技术结合而成的一门生物新技术。也就是，利用离体酶或者直接利用微生物细胞、动植物细胞、细胞器的特定功能，借助于工程学手段来生产酶制剂，并应用于相关行业的一门科学。它在工业、农业、化工、医药、食品和保健工业及其他各方面发挥着越来越重要的作用。

酶工程对食品工业的影响很大，并且酶工程在生物技术的各个方面也显得越来越重要，这种新型的生物技术正在对世界产生巨大的经济效益和社会效益，酶工程的一般工艺流程见图 4-1。

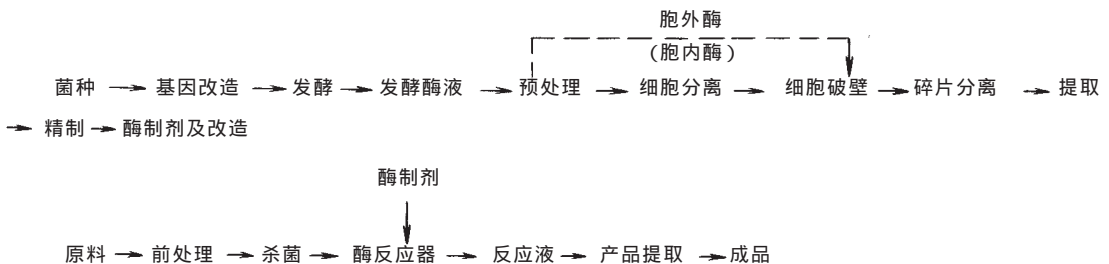


图 4-1 酶工程一般工艺流程示意图

(引自毛忠贵)

酶工程的发展大体经历了以下几个时期：20 世纪 50~60 年代早期的酶工程技术，主要是从动物、植物和微生物原料中提取、分离、纯化制造各种酶制剂，并将其应用于化工、食品和医药等工业领域。其中从动植物组织中大量提取酶，涉及原料、技术、经济和伦理上的问题，难以满足要求，其重点主要是放在以微生物酶为主体上。20 世纪 70 年代后期，酶的固定化技术取得了突破，使固定化酶、固定化细胞、生物反应器与生物传感器等酶工程技术迅速获得应用。目前，

各种酶工程技术已用于制造多种精细化工产品和医药产品，并且在食品工业、化学检测和环境保护等各个领域得到了有效的应用。多酶反应器和仿生技术等领域的的应用，有待科学家们去继续研究和开发。

二、酶制剂的生产

包括菌种的来源、产酶菌种的分离、筛选、育种和酶的发酵生产等，这些内容请参阅本书的其他章节。

三、微生物细胞的破碎

微生物培养后产生酶的存在状态有两种，一种是能分泌透过细胞壁到细胞外部的酶称为胞外酶；另一种是存在于细胞内部的，称为胞内酶。对于胞内酶的提取，需要破碎技术，胞外酶则无需破碎。破碎的目的是将细胞壁和细胞膜破坏掉，使胞内物质释放出来。不同种类的微生物细胞壁的组成和结构差异很大，取决于遗传信息、培养生长条件和菌龄等。需根据破碎对象的性质来选用具体的破碎方法。

(一) 机械破碎法

1. 高压匀浆法 (high-pressure homogenization) 这是利用高压匀浆器，大规模破碎细胞的一种常用方法。匀浆器中有高压室、针形阀、撞击环等结构，高压室能产生几十兆帕以上的高压，使细胞悬浮液喷向针形阀，悬浮液从针形阀喷出时，突然减压，速度可达每秒几百米，这种高速的浆液又射到静止的撞击环上，被迫改变方向从出口管流出。细胞在高压匀浆器中一系列的高速运动过程中，经历了剪切、碰撞和由高压到常压的变化，从而造成细胞破碎。此法非常适合于细菌和酵母的破碎，不适合于丝状真菌及某些基因工程菌。本方法一次可处理几升悬浮液，一般循环 2~3 次后，足以达到细胞破碎要求。

2. 珠磨法 (bead mill) 利用直径小于 1mm 的玻璃小珠、石英砂、氧化铝等作为研磨剂，在珠磨机中与细胞悬浮液在一起快速搅拌和研磨，它们之间互相碰撞、剪切，使细胞破碎，释放出胞内物。该法适合于各种微生物细胞的破碎。珠磨法是一种有效的细胞破碎法，图 4-3 为珠磨机的结构示意图。其工作原理是：进入珠磨机的

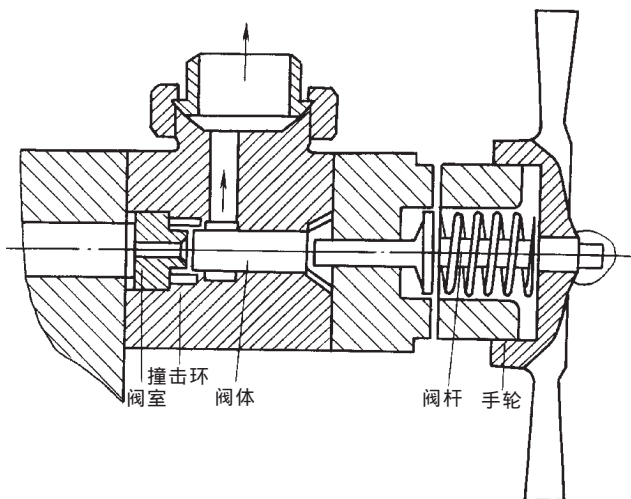


图 4-2 高压匀浆器的排出阀
(引自俞俊堂、唐孝宣)

细胞悬浮液与极细的玻璃小珠、石英砂、氧化铝等研磨剂（直径 $<1\text{mm}$ ）一起快速搅拌或研磨，研磨剂与细胞之间互相剪切、碰撞，使细胞破碎，释放出内含物。在珠液分离器的协助下，珠子被滞留在破碎室内，浆液流出，从而实现连续操作。破碎中产生的热量一般采用夹套冷却的方式带走，但在大型设备中，采用夹套冷却带走热量是一个需要考虑的问题。

3. 超声破碎法（ultrasonication）该法也是应用较多的一种破碎方法。其破碎机理尚不清楚。可能与超声振荡引起的空化现象（cavitation phenomena）和剪切作用有关。一般采用 $15\sim 25\text{kHz}$ 的频率操作。它对杆菌的破碎较容易，对酵母菌的破碎效果较差。

（二）非机械破碎法

1. 酶溶法（enzymatic lysis）利用酶反应，分解破坏细胞壁上的特殊键，从而达到破壁的目的。酶溶法分为外加酶法和自溶法。在外加酶法中，常用的有溶菌酶（lysozyme）、蛋白水解酶（protease）、糖苷酶（glycosidase）或肽键内切酶（endopeptidase）等，它们对细胞壁或细胞膜进行酶解，使细胞崩解破碎。在细胞工程中，酶溶法大量用来剥离细胞壁，将原生质体进行融合。自溶法是在微生物生长代谢过程中，控制一定条件，诱发微生物产生多量的溶胞酶或激发自身溶胞酶的活力，以达到细胞自溶的目的。

2. 化学渗透法（chemical permeation）用有机溶剂、变性剂、表面活性剂、抗生素或金属螯合物等处理，使细胞壁或膜的通透性（渗透性）改变，从而使胞内物质有选择地渗透出来。

其他还有渗透压法、冻融法、干燥法和激光破碎法等。

四、酶的提取与纯化

工业用酶一般用量较大，纯度要求不一样。例如，用于皮革工业的蛋白酶和纺织工业的淀粉酶，纯度不需要高；而用于食品、医药、分析测试等用途的酶必须要有高纯度，在提取的过程中需要纯化处理。酶的提取是指在一定条件下，用适当的溶剂处理含酶原料，使酶充分溶解到溶剂中的过程，也称作酶的抽提，亦即初步纯化。常用的方法有：①盐溶液提取。大多数酶溶于水，而且在一定浓度的盐存在时，酶的溶解度增加。一般采用稀盐溶液进行酶的提取，盐浓度一般控制在 $0.02\sim 0.5\text{mol/L}$ 范围内。②酸溶液提取。有些酶在酸性条件下溶解度较大，且稳定性较好，常采用 0.12mol/L 的硫酸溶液进行提取。③碱溶液提取，常用 $\text{pH } 10\sim 12.5$ 的碱溶液处理 20min 。④有机溶剂提取。有些与脂质结合比较牢固或分子中含非极性基团较多的酶，不溶或难溶于水、稀酸、稀碱和稀盐溶液中，需用有机溶剂提取，常用的有机溶剂是与水能够混溶的乙醇、丙酮或丁醇等。酶的精制，即高度纯化方法很多，常见的有：①沉淀法、②超滤法、③层析分离法、④结晶法等。其中沉淀法和超滤法既可用在初步纯化中，也可用在精制之中。大分子蛋白质精制依赖于层析分离等。根据酶分子的不同特性，可以采用以下一种或几种方法来进行提取和精制。

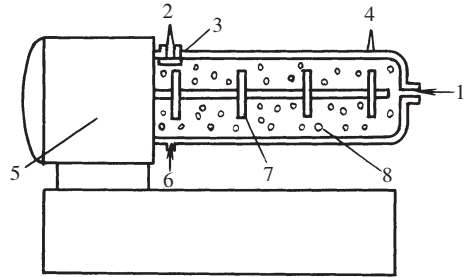


图 4-3 水平搅拌式珠磨机结构示意图
1. 细胞悬浮液 2. 细胞均浆液 3. 珠液分离器
4. 冷却液出口 5. 搅拌电机 6. 冷却液进口
7. 搅拌桨 8. 玻璃珠
(引自毛忠贵)

(一) 根据酶分子溶解度不同的方法

通过改变某些条件,使溶液中某种物质的溶解度降低,从而从溶液中沉淀析出,达到与其他溶质分离的目的。这种沉淀分离法在酶的分离纯化过程中,经常采用。

1. 盐析沉淀法 盐析沉淀法是蛋白质和酶分离纯化中最早应用,而且至今仍在广泛使用的方法。一般在低盐浓度时,蛋白质和酶的溶解度随盐浓度的升高而增加,而当盐浓度升高到一定数值时,其溶解度又随着盐浓度的升高而降低,结果使蛋白质和酶沉淀析出,这种现象叫盐析。在某一浓度的盐溶液中不同的蛋白质和酶的溶解度不相同,因而可达到彼此分离的目的。通常采用的盐有硫酸铵、硫酸钠、磷酸钾、硫酸镁、氯化钠和磷酸钠等。其中以硫酸铵最为常用,因为它在水中的溶解度大而温度系数小,不影响酶的活性,分离效果好,而且价廉易得。盐析沉淀所得到的产品常含有大量盐分,一般可用超滤或层析等方法脱盐,使酶进一步纯化。

2. 等电点沉淀法 利用两性电解质在等电点时溶解度最低,以及不同的两性电解质具有不同等电点这一特性,对酶、蛋白质、氨基酸等两性电解质进行分离纯化。在酶的沉淀分离中,等电点沉淀法经常与盐析沉淀、有机溶剂沉淀和复合沉淀等方法一起使用,使其沉淀完全。

3. 有机溶剂沉淀法 利用酶等物质在有机溶剂中的溶解度不同而使其分离。常用的有机溶剂有乙醇、丙酮、异丙酮、甲醇等。其用量一般为酶液体积的2倍左右,终浓度约70%,但不同的酶和不同的溶剂,其使用浓度也不同。

4. 复合沉淀法 在酶液中加入某些物质,使它与酶形成复合物而沉淀下来,分离出沉淀后,再用适当方法将酶从复合物中重新析出。能与酶形成复合物沉淀的物质,常有单宁、聚丙烯酸等高分子聚合物。

(二) 根据酶分子大小和形状不同的方法

1. 离心分离法 离心分离法是借助于离心机旋转所产生的离心力,使不同大小和不同密度的物质分离的技术。在酶的提取分离纯化过程中,细胞的收集、细胞碎片和沉淀的分离以及酶的纯化等往往要使用离心分离。

2. 凝胶过滤法 凝胶过滤又称为分子排阻层析、分子筛层析、凝胶层析,是利用具有一定大小网状的凝胶颗粒(固定相)填充柱的分子筛作用,利用溶液中各组分的分子量不同来进行层析分离的一种方法。凝胶层析是20世纪50年代末期60年代初期才发展起来的一种快速又简便的层析分离技术,设备简单,操作方便,不需要经过再生处理就可反复使用。凝胶过滤法使用于不同分子量的各种物质的分离,已广泛地用于酶的分离纯化。凝胶是具有网状结构的多孔性高分子聚合物。在凝胶过滤法中使用的凝胶,都制成颗粒状,经一定方法处理后装进凝胶层析柱使用。当酶液在层析柱内流过时,酶液中各组分分子在柱内同时进行向下的移动和不定向的分子扩散运动。各种溶质分子由于分子量大小和分子形状的不同,大分子物质(酶蛋白等)由于分子直径大于凝胶孔径,难于进入凝胶的微孔被凝胶排阻,只能分布在凝胶颗粒的间隙中随流动相向下移动,速度较快,所以大分子以较快的速度流过凝胶柱。小分子蛋白质则进入凝胶颗粒的小孔内,不断地进出于一个个胶粒的微孔内外,路径加长,移动缓慢。这样就使小分子物质向下移动的速度落后于大分子物质。这样通过适当长度的层析柱后,溶液中各组分按分子量从大到小的顺序,先后流出层析柱,大小不同的分子蛋白就被分开了,从而达到酶的分离纯化(图4-4)。常用的凝胶有琼脂凝胶(Sephrose)、聚丙烯酰胺凝胶(Biogel)和葡聚糖凝胶(Sephadex)等。该

方法除了用于分离蛋白质，还常用于测定未知蛋白质的分子量。

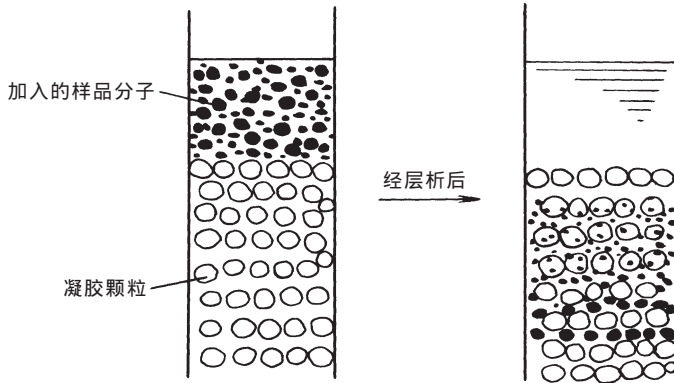


图 4-4 凝胶过滤分离示意图

(1) 琼脂和琼脂糖凝胶。琼脂是一种天然的多糖混合物，将琼脂加一定量的水加热溶解后，冷却凝固成凝胶，琼脂凝胶有较大的空隙，能分离的物质分子量范围较大。但其强度较差，而且含有大量负电荷，用于凝胶层析时，会影响物质的分离效果。琼脂中带负电荷的组分为琼脂胶 (agaropectin)，含有磺酸基和羧基，通过精制可将琼脂胶除去，从而得到不带电荷的琼脂糖 (agarose)。琼脂糖是由 D-半乳糖和 3, 6-脱水 L-半乳糖相间结合的多糖。琼脂糖可制成各种型号的琼脂糖凝胶。其商品名有多种，如瑞典的 Sepharose、美国的 Biogel 和丹麦的 Gelarose 等，它们对蛋白质和多糖等的分离范围（分子量）稍有不同。琼脂糖凝胶的优点是多孔，液体流动性好，取代基团多，对物质的吸附性弱，分离范围较大，适用于蛋白质、酶、多糖等多种物质的分离。但其稳定性差，温度超过 40℃ 会融化，使用时 pH 范围在 4~9 之间。为了改善琼脂糖的稳定性，可用双环氧丙烷等双环氧化物将它交联，制成交联琼脂糖凝胶，它的结构坚实，保持了原有的多孔性和流动性等优点。使用的 pH 范围扩宽到 3~12，并可在 120℃ 以下加热灭菌，使之能更广泛使用。

(2) 聚丙烯酰胺凝胶。聚丙烯酰胺凝胶是以丙烯酰胺为单体，以甲叉双丙烯酰胺为交联剂聚合而成的高分子聚合物。商品名为 Biogel P。聚丙烯酰胺凝胶的化学稳定性好，强度高，通过改变单体和交联剂浓度可使聚合凝胶的孔径改变。但在浓酸或浓碱的作用下，酰胺键会水解而生成羧基，使凝胶带上电荷成为离子交换基团，而影响凝胶层析效果。所以聚丙烯酰胺凝胶适宜在 pH 2~11 的范围内使用。使用时应根据欲分离物质的分子量大小，选择各自适宜的聚丙烯酰胺凝胶型号。

(3) 葡聚糖凝胶。葡聚糖凝胶是以葡聚糖（葡萄糖通过 α -1, 6 糖苷键结合成的线形高分子）为单体，以环氧氯丙烷为交联剂，聚合而成的高分子聚合物。根据交联度的不同商品葡聚糖凝胶从 G-10 至 G-200 共有 8 种型号，交联度大的，所采用的葡聚糖单体的分子量较小，凝胶孔径较小，适用于较小分子的分离。例如 Sephadex G-25，是用分子量 4~5 万的葡聚糖单体交联成的，适用于分子量为 1 000~5 000 的蛋白质分子等的分离。反之交联度低的所采用的葡聚糖单体的分子量较大，适用于较大分子的分离。如 Sephadex G-200，是采用分子量 20 万左右的葡聚糖单体交联

成的,适用于分子量为5 000~500 000的蛋白质分子的分离等。使用时应根据欲分离的物质分子量大小来选择适宜的凝胶。葡聚糖凝胶具有良好的化学稳定性和热稳定性。在0.2 mol/L的盐酸溶液中放置半年其性质不变,干胶在120℃以下加热不受影响。所以,广泛地应用于酶和其他物质的分离纯化。

3. 透析、超滤、反渗透和电渗析 透析、超滤、反渗透和电渗析等,均属于膜分离技术。透析法是利用化学能(扩散速度差)进行的,超滤和反渗透都是利用力能(压力差)进行的,电渗析是利用电能(电位差)进行的。借助于一定孔径的各种高分子薄膜,将不同大小、不同形状的和不同特性的物质颗粒或分子分离的技术,统称为膜分离技术。膜分离所使用的薄膜主要是由丙烯腈、醋酸纤维素、硝酸纤维素、赛璐玢及尼龙等高分子聚合物制成的高分子膜,有时也可用动物膜和羊皮纸等。在膜分离过程中,膜的作用是选择性地让小于其孔径的物质颗粒或分子通过,而把大于其孔径的颗粒截留,故此膜的孔径有多种规格供使用时选择。

(1) 透析。透析是指利用小分子物质的扩散作用,不断透过半透膜到膜外,而大分子被截留,从而达到分离目的。透析膜可用动物膜、羊皮纸、火棉胶或赛璐玢等制成。使用时可做成透析管、透析袋或透析槽等形式。透析时,样品液装在透析袋内,袋外是水或者缓冲液,在一定的温度下,透析一段时间后,使小分子物质从透析袋内透出到袋外。必要时袋外的水或缓冲液可以更换,或连续补充水或缓冲液,而同时连续排出渗出液,以提高效果。透析设备简单,操作简便,但透析时间长,若不更换水或缓冲液时,只扩散到膜内外平衡为止。透析结束时,透析袋内的保留液体积较大,浓度较低。透析主要用于酶、蛋白质、核酸等生物大分子的分离纯化,从中除去小分子物质。透析在酶纯化过程中极为常用,通过透析可以除去酶液中的盐类、有机溶剂、低分子量的抑制剂等。透析膜(袋)的截留极限一般在MW 5 000左右,如果将分子量小于一万的酶液进行透析就有泄漏的危险。透析袋在使用前最好在EDTA-NaHCO₃溶液中煮过,还应检查一下有无破损泄漏处。透析袋使用后,一般可用清水冲洗干净,再次检查是否完好,然后浸入75%乙醇溶液中保存备用。

(2) 超滤。超滤是借助于超滤膜将不同分子量的物质分离的技术,是在一定的正压力或负压力驱动下,将料液强制通过一定孔径的超滤膜,部分小分子的溶质和溶剂透过膜而成为超滤液,而大分子的酶和蛋白质等物质被截留,从而达到分离纯化的目的,也可用于酶液的浓缩和脱色。超滤膜截留的颗粒直径范围为2~200nm,相当于分子量1 000~500 000。构成超滤膜的主要材料有醋酸纤维或硝酸纤维及尼龙或丙烯腈、聚矾等。超滤膜一般由两层组成,表面厚度为0.5~1μm,孔径有多种规格,从2~200nm组成系列产品,根据需要选用。基层厚度为200~250μm,强度较高。使用时注意方向,将表层与待超滤的溶液接触,否则会影响超滤效果和膜的寿命。超滤膜的种类有平面膜、管式膜、中空纤维式和螺旋卷绕式等,以满足不同的要求。

超滤过程中,小分子物质与溶剂(一般是水)分子一同透过膜孔渗出,不同孔径的膜有不同的透过性,膜的透过性一般以流率表示,单位为mL/(cm²·min)。它指每平方厘米的膜每分钟透过的流体的量。超滤时流率一般为0.01~5mL/(cm²·min)。孔径大时流率也大。

影响流率的主要因素有膜孔径的大小。颗粒的性状与大小、溶液浓度、操作压力、温度和搅拌条件等条件。溶液中颗粒的性状与大小不同,其超滤流率也不同。一般来说,相对密度小的分子透过性较好,球状分子比相同分子量的纤维状分子透过性好,小分子比大分子的透过性好;溶

液的浓度越高，超滤流率越小。故此，超滤时溶液浓度不宜太高，在超滤高浓度溶液时，可通过补充溶剂（水）使其稀释以提高流率。操作压力对超滤流率的影响比较复杂，一般情况下，压力增加，超滤的流率也增加，但对于一些胶体溶液，当压力高到一定程度后，再增加压力，超滤流率不再增加。对于一般溶质分子，压力增加时其透过性提高，但某些溶质分子则相反。超滤时的操作压力一般控制在 $50 \sim 700 \text{ kPa}$ 。压力可由压缩气体来维持。适当提高温度、增加搅拌速度等都有利于提高超滤流率；但温度和搅拌速度过高时，容易引起酶和其他活性大分子变性失活。

超滤不仅使酶得以分离纯化，还能达到酶液浓缩的目的，特别适用于液体酶制剂的生产。但对超滤膜的要求较高，对于那些需要小分子辅酶的酶的生产不适用。

(3) 反渗透。反渗透膜的孔径小于 2 nm ，被截留的物质分子量小于 1000 ，操作压力为 $0.7 \sim 13 \text{ MPa}$ ，主要用于分离各种离子和小分子物质。在海水淡化、纯水精制等方面使用。

反渗透与超滤的区别在于被分离的对象物质不同，超滤分离的对象是高分子物质或固体颗粒，此类物质的渗透压大多很低，一般可忽略不计，而反渗透分离的对象是水等小分子物质，渗透压较大，这种不能忽略渗透压的则为反渗透。其次，两者的操作压力不同，超率一般采用低压，而反渗透必须采用高压。反渗透操作时采用的操作压力需要数倍或数十倍于渗透压，例如，海水淡化，含盐 3.5% 海水的渗透压为 24 个大气压（约 2.4 MPa ），而操作压力一般需 100 大气压（约 10 MPa ）。

(4) 电渗析。电渗析是用两块半透膜将渗析槽分割成三个室，两块膜之间的中心室通入待分离的液体，在两侧的室中装入水或缓冲液，并分别装上正、负电极，接通直流电源后，中心室溶液中的阳离子向阴极移动，透过半透膜到达阴极槽，而阴离子则移向阳极槽，从而达到分离的目的（图 4-5）。电渗析主要用于酶液或其他溶液的脱盐、海水淡化、纯水制备及其他带电荷的小分子的分离。也可将凝胶电泳后的含蛋白质或核酸等的凝胶分开，放于中心室经电渗析，使带电荷的大分子与凝胶分离。

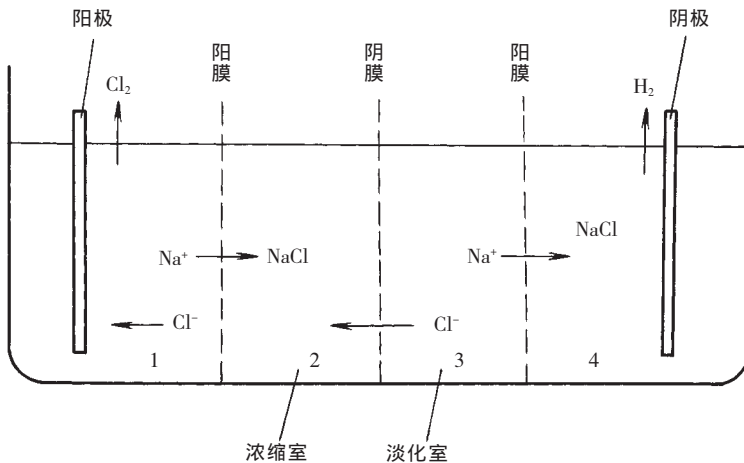


图 4-5 电渗析作用机理

(三) 根据酶分子电荷性质的方法

1. 离子交换柱层析 离子交换柱层析是依据被分离物质与分离介质（离子交换剂）间异种

电荷的静电引力的不同来进行物质分离的。不同离子交换剂上的可解离基团对各种离子的亲和力不同,而使不同物质分离。

离子交换剂是含有若干个活性基团的不溶性高分子物质。通过在不溶性高分子物质(母体)上引入若干个可解离基团(活性基团)而制成。离子交换剂根据活性基团的性质分为两大类,即阳离子交换剂和阴离子交换剂。由于酶具有两性性质,故可用阳离子交换剂,也可用阴离子交换剂进行酶的分离纯化。各种蛋白质分子因暴露在分子外表面的侧链基团的种类和数量不同,在一定离子强度和 pH 的缓冲液中,所带电荷的情况也是不相同的。当溶液的 pH 大于酶的等当点时,酶分子带负电荷,可用阴离子交换剂进行层析分离;当溶液的 pH 小于等电点时,酶带正电荷,则要采用阳离子交换剂。根据不同的蛋白质与离子交换剂的亲和力不同而达到分离的方法称为离子交换层析。离子交换剂按母体的不同可分为离子交换树脂、离子交换纤维素和离子交换凝胶等。其中离子交换树脂主要用于分子量较小的物质分离纯化,只有某些大孔径的离子交换树脂可用于酶的分离纯化。离子交换纤维素是以纤维素为母体引入活性基团而制成,亲水性能好,活性基团分布在纤维素表面,交换容量大,是目前在酶的分离纯化方面广泛应用的离子交换剂。常用的有 DEAE-纤维素、AE-纤维素、CMC 等。离子交换凝胶是以葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等凝胶为母体引入若干活性基团制成。这种离子交换剂同时具有离子交换和分子筛的作用,交换容量大,分辨能力强,在酶的分离纯化方面具有广阔的应用前景。常用的有 DEAE-葡聚糖凝胶、DEAE-聚丙烯酰胺凝胶、DEAE-琼脂糖凝胶、CM-凝胶、SP-葡聚糖凝胶等。进样时加入的样品体积尽可能小,才能得到较高的分辨率。洗脱时,可以通过提高洗脱液的离子强度,减弱蛋白质分子与载体亲和力的方法,逐一洗脱蛋白质组分,也可改变洗脱液的 pH,使蛋白质分子的有效电荷减少而被解吸洗脱。

离子交换层析主要的操作过程如下:

(1) 离子交换剂的处理与装柱。将干燥的离子交换剂用水浸泡 2h 以上,充分吸水膨胀后,减压抽去气泡,倾去水,用去离子水洗至澄清,再先后用 4 倍体积左右的 2mol/L HCl 和 2mol/L NaOH 各浸泡 4h,再用去离子水洗至中性。然后再经转型处理,使离子交换剂所带的可交换离子转变为适当的离子型,如阳离子交换剂用 NaOH 处理,转为钠离子型,用 HCl 处理转为氢离子型等;阴离子交换剂用 NaOH 处理成 OH^- 型,用 HCl 处理成 Cl^- 型等。

转型后的离子交换剂小心装进交换柱中,装柱的好坏对分离效果有影响,要求装填得均匀,无气泡无裂缝,装好后,保持液面在交换剂平面以上,防止空气进入。

使用过的交换剂也需经转型,得以再生后贮存,以等待重复利用。使用过的离子交换剂可用 2mol/L NaCl 彻底洗涤,阳离子交换剂转成氢离子型或盐型贮存,弱碱性阴离子交换剂以 OH^- 型贮存,中等碱性和强碱性阴离子交换剂以盐型贮存,并且加入适当的保存剂,如 0.03% 甲苯、0.002% 洗必太等。

(2) 上柱。打开离子交换剂出口阀,让柱内液体慢慢流出。当液面刚好到达交换剂表面时,小心加入酶液,使酶液尽快均匀地分布于交换剂的表面,然后均匀进入交换剂层进行交换。继续加入酶液直至交换剂的交换容量饱和为止。上柱时注意酶液的 pH、温度和离子强度等条件,并控制好流速,流速太快时分离效果不好;反之,则影响分离速度。有时由于离子交换剂颗粒太细,或柱较高,或酶液浓度黏度较高等原因,引起流速太慢时,可采用在柱进口适当加压,或在

柱出口适当减压的方法以加快离子交换层析速度。

(3) 洗脱和收集。上柱完毕后,先用水或缓冲液流过层析柱,使未吸附的物质洗出,然后用适当的洗脱液,将吸附在离子交换剂上的离子,按亲和力最小至最大的顺序洗脱下来,分别收集,以达到分离的目的。酶液中除了含有欲得到的某种酶以外,还含有各种杂质,由于酶和杂质与离子交换剂的亲和力不同,采用适当的洗脱液洗脱,可使酶与杂质分开。有时酶液中所含的组分很复杂,用一种洗脱液还达不到良好的分离效果。为此,可采用连续式的或阶梯式的梯度洗脱法,即采用按一定规律改变 pH 梯度或盐浓度梯度的洗脱液进行洗脱。连续梯度洗脱液可按预先设计的梯度范围,在梯度混合器中配置。阶梯式梯度洗脱液则分别配置几种不同 pH 或不同盐浓度的缓冲液,使用时按设计好的次序依次洗脱。

(4) 离子交换剂的再生。当离子交换剂含杂质较少时,再生只用酸、碱或盐进行转型即可。反之,则要先经过酸碱浸泡清洗,用水洗至中性,然后再转型,以供下次上柱交换。如果离子交换柱要较长时间停用,可在再生后加入适当的防腐剂以防止微生物生长。阳离子交换树脂常用 0.02% 的叠氮钠作为防腐剂,阴离子交换树脂常用 10mL 的苯乙酸汞作为防腐剂。

2. 层析聚焦 该方法相似于等电聚焦电泳,区别仅在于其连续稳定的 pH 梯度是在固相的离子交换载体上形成的。一般以孔径 10~100 μm 、表面含有强缓冲能力离子的离子基团(如聚乙烯酰亚胺)的二氧化硅作为层析介质。当两性电解质组成的多元缓冲液流过时,能形成一个 pH 梯度(图 4-6)。

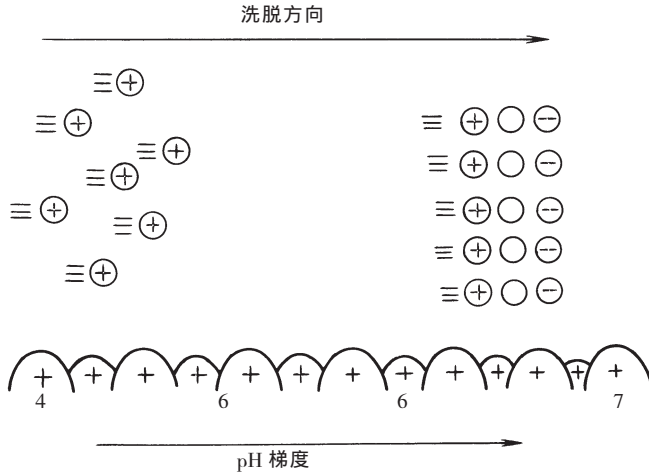


图 4-6 层析聚焦效应示意图

层析聚焦法有等电聚焦的高分辨率和柱层析容量大的特点,具有较大的应用价值。

3. 电泳分离 在外电场作用下,不同蛋白质离子所带净电荷的多少和性质不同,因而其向两极泳动的方向和速度也不相同,从而达到分离的目的。为了减少对流扩散,电泳过程是在浸透了缓冲液的聚丙烯酰胺凝胶、淀粉胶等介质上进行的。电泳分离的蛋白质量通常较小(约数毫克),常用作分析用。但现在已发展了制备电泳,用这种方法制备的酶,可以在介质中洗脱或直接从电泳柱底部依次流出。

4. 等电聚焦电泳 先从阳极顶端扩散装入一种酸(如磷酸), 然后从阴极端扩散装入一种碱(如乙醇胺), 用具有不同等电点的脂肪族聚氨基聚羧基化合物作为两性电介质载体, 当阴阳两极通电以后电介质在一定范围内便形成 pH 梯度, 当该载体电介质同样品一起电泳时, 蛋白质便朝其各自等电点相等的 pH 位置移动而被浓缩。此法不但可将各种酶精确分开, 通过测定各段的 pH 还可以了解该酶的等电点(图 4-7)。用这种方法可以分离和检出等电点相差仅 0.02 的两种蛋白质成分。

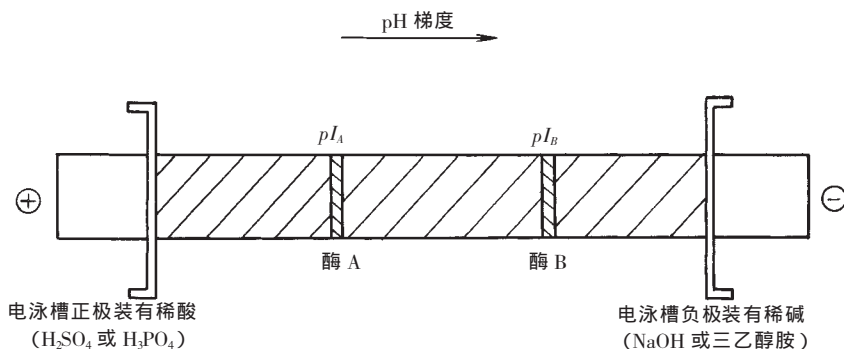


图 4-7 等电聚焦法分离酶蛋白

(四) 根据酶分子专一性结合的分离方法

1. 亲和层析 酶的底物、底物类似物及酶的竞争性抑制剂同酶间有着较高的亲和力, 可作为配基 (ligand) 固定于不溶性载体, 可选择性地将酶吸附而同杂质分离。然后通过改变缓冲液的离子强度和 pH 的方法, 也可以使用浓度更高的同一配体溶液或亲和力更强的配体溶液, 将酶洗脱下来(图 4-8)。

将欲分离的混合液加入层析柱的上部(图 4-8a) 令其流入柱内, 然后加入洗脱剂 (eluant) 冲洗(图 4-8b), 如果各组分固定相不发生作用, 则各组分都以流动相(洗脱剂)的速度向下移动, 因而得不到分离。实际上各组分和固定相间常存在一定的化学亲和力, 如果亲和力大小不同, 则各组分的移动速度也不一样, 因而产生差别阻滞。图 4-8 中各组分对固定相亲和力的次序为白球分子 \circ > 黑球分子 \bullet > 三角分子 \triangle 。当继续加入洗脱剂时, 如果柱有足够长度, 则三种组分逐渐分层(图 4-

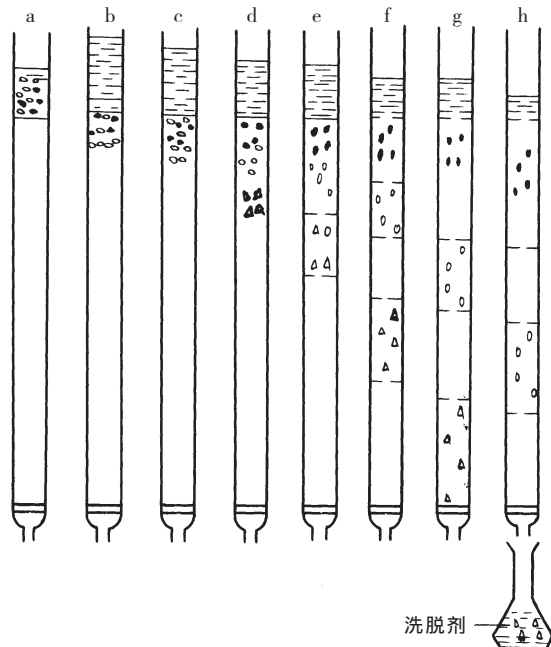


图 4-8 亲和色层分离法示意图

8 c~g)。三角分子跑在前面,最先从柱中流出(图 4-8h)。加入洗脱剂而使各组分分层的操作称为展开(development),洗脱时从柱中流出的溶液称为洗脱液(eluate)。而将展开后的各组分的分布状况称为色谱(chromatograph)。

2. 免疫吸附层析 是利用抗原-抗体的高亲和性反应原理进行酶的分离纯化。通常利用小鼠免疫制备克隆抗体(McAb),因为这种方法所需的抗原量极少,有时 50 μ g 便足够用,也无须太纯,要从同一抗原产生的许多不同 McAb 中挑选出亲和力和适中的抗体来制备亲和介质,这样既能高效吸附目的酶,又可避免后面洗脱困难的问题。

3. 染料配体亲和层析 由于染料分子与被纯化的酶没有任何生物学关系,因此,严格地说,只能被称为假亲和层析。尽管它们的分子结合机制尚未搞清楚,但已被证明是分离含 NAD⁺ 及 NADP⁺ 的脱氢酶和与 ATP 有关的激酶类的有效方法。染料配体的层析效果除主要取决于染料配基与酶亲和力的大小外,还和洗脱时缓冲液的种类、离子强度、pH 及待分离的酶样品的纯度有关。层析操作最好在离子强度 ≥ 0.1 和 pH ≥ 7 时进行,这样可避免固定化染料可能引起的阳离子交换剂的作用。

4. 共价层析 利用层析与被分离酶间形成共价键(如二硫键等)而达到分离目的,目前在巯基酶的分离纯化中应用较多。也可用来分离含巯基的多肽片段以及汞化的 mRNA。由于偶联反应是可逆性的,因此可在洗去那些没有吸附上的物质后,用含有能还原二硫键的低分子量化合物的洗脱剂洗脱酶。

(五) 根据分配系数的分离方法

当水溶液中含有一种或一种以上的亲水性聚合物时,当聚合物的浓度达到一定水平则形成不相混溶的,可分离的两相。此两相中的任何一相都含有较高的水分,因样品中的细胞碎片、多糖、核酸和酶等在两相中具有不同的分配情况,经过多次处理,酶可以和杂质有效分离,这种分离方法称为双水相萃取法。常用的相系统有聚乙二醇(PEG)/葡聚糖(DEXTRAN)、PEG/磷酸盐、PEG/硫酸铵等。该方法具有含水比例高、选用的聚合物及盐类对酶无毒性、分离设备与化学工业通用等优点,因而已有二三十种的微生物酶已应用此技术纯化。

(六) 其他分离方法

除了上述的主要方法外,还有其他许多方法也可用于酶纯化,如无机吸附层析、疏水吸附层析、薄层层析、高效液相色谱、冷冻干燥、亲和超滤、亲和分配、亲和电泳等。

对目标酶而言,可以有多种纯化方法,实际采用哪种方法,其决定因素是产品的质量要求和方法的经济性。在符合使用标准的前提下,采用的方法应为步骤简单、收率高和成本低为好。一般来说,根据溶解度变化的纯化方法较适宜于早期纯化阶段,规模较大;而柱层析法或电泳分离更适宜于后期的纯化过程,规模较小。硫酸铵盐法等提纯速度快一些,柱层析纯化速度慢一些。某些价格昂贵的层析介质及方法,可只用于纯化过程的最后几步。

(七) 酶的纯度与酶活力

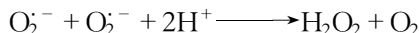
酶纯化的目标是使酶制剂具有最大的催化活力和最高纯度。经分离纯化的酶,应设法检验其纯度和酶活力,以决定是否有进一步纯化的必要。许多分离方法都可用于检验酶的纯度,实验室常用聚丙烯酰胺凝胶电泳来检验酶的纯度。由于酶分子结构高度复杂,同一酶制剂,采用不同方法检验结果可能不一致,所以酶的纯度应注明达到哪种纯度,如电泳纯、层析纯、HPLC 纯等

等。酶的纯度也可用酶的比活力来衡量，比活力是指以每毫克蛋白所具有的酶活力单位数。一般情况下，酶的比活力随酶的纯度的提高而提高。

测定酶活力可采用中止反应法，或连续反应法，或采用酶分析自动化反应仪器操作进行。反应方法可采用化学法、放射性化学法或酶偶联法等。

中止反应法是在恒温反应系统中进行酶促反应，间隔一定的时间，分几次取出一定容积的反应液，使酶停止作用，然后分析产物的生成量或底物的消耗量。几乎所有的酶都可根据这一原理，设计出测定其活力的具体方法。连续法测定酶活力，不需要取样中止反应，而是基于反应过程中光谱吸收、气体体积、酸碱度、温度、黏度等的变化，用仪器跟踪检测反应进行的过程，记录结果，算出酶活性。连续法使用方便，一个样品可多次测定，但很多酶反应不能用该法测定。自动化酶分析仪从加样、启动反应、检测、数据记录及结果处理等，整个过程均由仪器自动完成。

例如，超氧化物歧化酶（SOD）的测定。SOD 是一类专门清除体内超氧阴离子的酶，催化反应为：



由于 O_2^- 在溶液中极不稳定，给酶活性测定带来许多不便。目前已有根据 O_2^- 的物理性质，测定 O_2^- 的歧化量，从而直接测定 SOD 活力的方法，如电子顺磁共振波谱法（ESR）、核磁共振法（NMR）、紫外分光光度法等。这里以邻苯三酚化学法为例：邻苯三酚在一定条件下发生自氧化反应，产生的 O_2^- 可通过自氧化速率来表示。加入 SOD 可抑制自氧化速率，由此计算出酶活力。SOD 单位定义为，一定的实验条件下（见操作），抑制率达到 50% 时的浓度为一个单位。

操作方法：在试管中加入 pH 8.2 的 50mmol/L tris-HCl 缓冲液 4.5mL，于 25℃ 保温 20min，然后加入预热的 45mmol/L 邻苯三酚溶液（对照管用 10mol/L HCl 代替）10 μ L，迅速摇匀倒入 1cm 比色杯，每隔 30s 在 325nm 处一次光吸收值，即可测出邻苯三酚的自氧化速率。一般要求自氧化速率控制在 0.070 O.D./min。

测酶或粗酶液活力时，方法同测自氧化速率相同，所不同的仅是在加入缓冲液后再加入 10 μ L 待测样品即可。酶活力计算方法如下：

$$\text{单位体积活力 (IU/mL)} = \frac{0.07 - \text{样液速率}}{0.07} \times 100\% \times \text{反应液总体积} \times \frac{\text{样液稀释倍数}}{\text{样液体积}}$$

$$\text{总活力 (IU)} = \text{单位体积活力 (IU/mL)} \times \text{原液总体积}。$$

用这种方法测定酶活力时，应注意由于邻苯三酚和被测样液的加入量只有 10 μ L，在整个反应系统中可忽略不计，故反应液总体积按 4.5mL 计算。

五、酶的改造与修饰

酶在生物技术中占有核心地位，因为几乎所有生物体内的反应都是在酶的催化下进行的。由于酶具有反应专一性、催化效率高和反应温和等优点，在工业、农业、医药、环保及能源等方面得到了越来越多的应用。但从数量上来说，目前发现的酶约有 3 000 种之多，但得到应用的只有

200种,大规模应用的仅有20种左右。我国酶制剂的产量已不少,但精制或高活性品种少,而且品种单调,应用面受到很大限制。导致这种现象的原因是多方面的,但酶本身在应用上暴露出来的一些性质上的缺点常常是根本的原因。这主要表现在下列几个方面:①酶一旦离开生物细胞本身特定的作用环境,在发酵、分离提纯、反应、制剂等过程中,常常显得不够稳定,不能适应大量生产条件的需要。②一般酶反应的环境基本接近中性,反应温度也与室温相近。但在工业应用上,由于底物、产物带来的影响,pH常常不在中性范围内,温度高时,酶促反应加快,但酶往往不稳定;温度低时,反应速度较慢,而且会导致微生物的污染。遇到底物不溶于水时,酶就更难发挥作用了。③米氏常数(K_m)值过大,通常使反应不能在低底物浓度下高速进行。由于体内各种代谢物质的浓度较低,这种酶用于工业生产时,有些底物,特别是产物对酶活性有抑制,天然酶的反应条件不能适应工业生产的要求。④在临床应用上,多数酶对于人体来说是外源蛋白质,具有抗原性,会引起过敏性或危险。由于这些原因,人们需要通过各种人工方法来改造酶,使其能适合于各行各业的需要。随着酶的结构、功能及其相互关系的研究、基因操作及固定化技术的普及,酶的改造已开始进入了实用阶段。通过各种方法使酶分子结构发生某些改变从而改变酶的某些特性和功能的过程称为酶分子改造或修饰。目前常用的主要修饰技术分述于下。

(一) 金属离子置换修饰

有些酶含有金属离子,而且金属离子往往是活性中心的组成部分,对酶的催化功能起重要作用。若从酶分子结构中除去原有的金属离子,酶往往会失活,若重新加入原有的金属离子,酶可以恢复,若加进不同的金属离子则可使酶呈现不同的特性,既可使酶活降低甚至失活,也可能使酶活提高并增加酶的稳定性。用于酶修饰的金属离子常是二价金属离子,该法只适用于天然结构中本来就含有金属离子的酶。

(二) 大分子结合修饰

利用水溶性大分子与酶结合,使酶的空间结构发生某些精细的变化,从而改变酶的特性与功能的方法称为大分子结合法。通常使用的大分子修饰剂有:右旋糖酐、聚乙二醇、肝素、蔗糖聚合物、聚氨基酸等。这些大分子在使用前一般需经过活化,然后在一定条件下与酶分子以共价键结合,从而达到修饰目的。该方法是目前应用最广的酶分子修饰方法。

(三) 肽链有限水解修饰

利用肽链的有限水解,使酶的空间结构发生某些精细变化,从而改变酶的特性和功能的方法称为肽链有限水解修饰。若肽链水解后引起酶活性中心的破坏,则酶将失去催化功能;若将肽链的一部分水解后,仍可维持其活性中心的完整构象,则酶的活力仍可保持或损失不多;若肽链的一部分水解除去后,有利于活性中心与底物的结合并形成准确的催化部位,则酶可显示出催化功能,或使酶活力提高。后两种肽链的水解在限定的肽键上进行,称为肽链有限水解。

(四) 酶的化学修饰

酶的化学修饰是在分子水平上对酶进行改造,即在体外,将酶的侧链基团通过人工方法与一些化学基团进行共价连接,从而改变酶学性质的技术。酶化学修饰所用的方法手段较多,但基本原则都是利用修饰所有的各类化学基团的特性,或直接或经过一定的活化过程,与酶分子上某种氨基酸残基(一般尽量选择非酶活必需基因)产生化学反应,对酶分子结构进行改造。开始设计酶化学修饰时,须要注意的是:

①修饰剂的要求：一般情况下，要求修饰剂具有较大的分子量、良好的生物相容性和水溶性、修饰剂分子表面有较多的反应活性基团及修饰后酶的半衰期较长。

②酶性质的了解：应该了解酶活性部位情况、酶反应最适条件和酶的稳定条件，酶分子侧链基团的化学性质及反应活泼性等。

③反应条件：修饰反应一般尽可能在酶稳定的条件下进行，尽量少破坏酶活性功能的必需基团。反应的最终结果是要得到酶和修饰剂的高结合率和高酶活回收率。因此，反应体系中酶与修饰剂的分子比例、反应体系的溶剂性质、盐浓度和 pH 条件，反应温度及时间等反应条件，皆需要经过大量实验才能确定。

1. 氨基的化学修饰 氨基修饰剂有许多种，例如各种酸酐、O-甲基异脲 (O-methylisourea)、右旋糖酐及右旋糖酐硫酸酯 (dextran and dextran sulphate)、糖肽 (glycopeptide)、葡萄糖凝胶 G-25 (sephadex G-25)、聚乳糖 (polylactose)、聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)、聚 (N-乙烯吡咯烷酮) [Poly (N-vinylpyrrolidone), PVP] 聚丙烯酸 (PAA) 等等。这些修饰剂作用于酶蛋白侧链上的氨基，或产生脱氨基作用，或与氨基共价结合将氨基屏蔽起来，使氨基原有的副键改变，从而改变酶蛋白的构象。例如，右旋糖酐常被高碘酸氧化开环后，再与氨基结合，其修饰过程如图 4-9 所示。

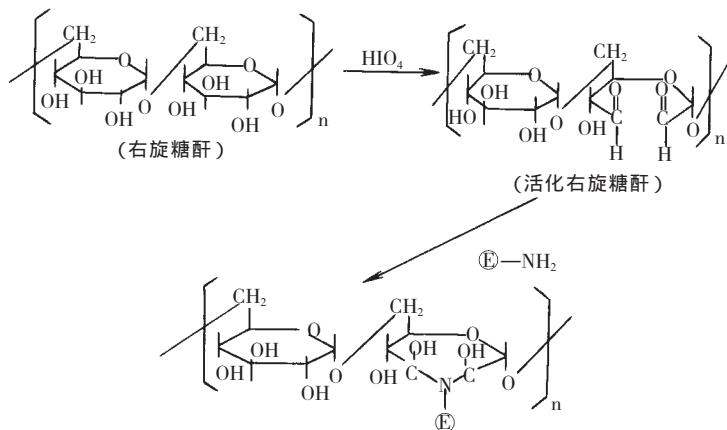


图 4-9 右旋糖酐的高碘酸氧化开环与酶的修饰

2. 羟基的化学修饰 目前常用的羧基修饰剂是各种水溶性碳化二亚胺 (water-soluble carbodiimide, 简称 WSC), 该修饰方法是先将 PEG 末端羟基转化成氨基, 然后通过 WSC 与酶分子上羧基反应, 产生共价交联。

3. 酪氨酸残基的化学修饰 酪氨酸残基是大多数酶蛋白组成上的一个重要基团, 酪氨酸残基能被许多试剂所修饰。四硝基甲烷 (tetranitromethane, TNM) 是其中的一种, 但 TNM 本身是一种易爆炸化合物, 且它与蛋白质的其他基团 (如巯基、蛋氨酸、色氨酸、组氨酸等) 也有副反应, 所以尽管它有反应条件温和等优点, 它的实际使用价值受到了限制。目前使用较多的是 N-乙酰咪唑 (N-acetylimidazole, N-AI)。

4. 精氨酸残基的化学修饰 酶蛋白中精氨酸残基的胍基具强碱性, 它们能抵抗大多数化学

处理，而修饰剂对它的作用条件也往往比较剧烈，所以必须考虑到在该反应条件下，蛋白质的其他基团受影响的可能性。一般来说环己酮、乙二醛、苯乙二醛等二羰基化合物及其衍生物是一类常用的精氨酸残基修饰剂。

5. 巯基的化学修饰 酶蛋白的巯基能同许多试剂作用，它们很容易同烷基化或芳香基化试剂反应，能与重金属离子结合，即使很温和的氧化剂也能使其氧化。蛋白质巯基常用的修饰剂有对一氯汞苯甲酸 (P-chloromercuribenzoate, PCMB)、二硝基二巯基二苯甲酸 (2, 2'-Dinitro-5, 5'-dithiodibenzoic acid, DTNB) 等。

6. 色氨酸残基的化学修饰 蛋白质分子中的色氨酸残基侧链吲哚，常常可以用各种氧化剂进行氧化而被修饰。常用的氧化剂有 N-溴代琥珀酰亚胺 (N-bromosuccinimide, NBS)、2-羟基-5-硝基溴苯 (2-hydroxy-nitrobenzyl bromide) 等。NBS 在酸性条件下能够选择性地氧化色氨酸残基侧链吲哚成为氧化吲哚，从而使蛋白质受到修饰。

(五) 酶基因与改造

利用基因操作技术改造酶主要包括三方面内容：一是用基因工程技术大量生产酶；二是修饰酶基因，产生遗传修饰；三是设计出新酶基因，合成自然界从未有过的酶。

近几年来，基因工程的迅速发展，使人们可以容易地克隆各种各样天然的酶基因，使其在微生物中高效表达，并通过发酵进行大量生产。目前已有尿激酶基因、凝乳酶基因等一百多种酶基因克隆成功。克隆是酶基因改造工程中的关键步骤，它将编码目的酶的基因插入适当的载体，然后带入与载体相容的宿主，并随宿主复制。当酶基因插入载体后，在宿主中有两种表达方式，一种是利用自身携带的起始密码子，启动合成与天然酶完全相同的酶；另一种是利用载体所具有的密码子，合成相应的融合蛋白，融合蛋白经化学或酶法水解后形成天然酶。寻找宿主菌株时，应满足以下几个特性：

- ①需要的目的酶能以活性形式分泌，而且目的酶占细胞总蛋白量的比例要高。
- ②菌体能利用廉价的原料进行大规模培养，生长条件不苛刻。
- ③载体与宿主相容，克隆酶基因的载体能在宿主中稳定维持。
- ④宿主的蛋白酶尽可能少，产生的外源酶不会被迅速降解。
- ⑤宿主不分泌毒素等对人类有害的物质。

纤维蛋白酶原激活剂和凝乳酶是应用基因工程获得大量酶的最成功例子。利用工程菌株生产的人纤维蛋白酶原激活剂，能使纤维蛋白酶原水解产生有活性的纤维蛋白酶，促进人体内血栓溶解。它在疗效上与人体合成的酶完全一致。目前已用于临床试验。

凝乳蛋白酶是生产乳酪的必需酶，最早的生产是从小牛的胃膜中提取，但动物供应量难以满足需要，后来直接从微生物中提取的凝乳酶又常常引起乳酪苦味。因此，克隆小牛凝乳酶基因在微生物中发酵生产，在食品工业上具有重要价值。利用酵母系统作为宿主产生的凝乳酶与从牛胃中提取的天然酶性质完全一致。

20 世纪 80 年代在基因工程基础上发展而来的酶的蛋白质工程，又被称为第二代遗传工程，是指通过改造与蛋白质相对应的基因中的碱基排列次序，或设计合成新的基因，将它克隆到寄主细胞中，通过基因表达而获得具有新的特性的蛋白质的技术。蛋白质工程主要步骤有：①新蛋白质结构的设计，②突变基因的核苷酸序列的确定，③突变基因的获得，④新蛋白质的产生。例如

枯草芽孢杆菌的蛋白酶，有一个容易被氧化的甲硫氨酸残基，位于活性中心 222 位，具有氧化不稳定性。当被 19 种氨基酸替代后，大部分突变型酶的氧化稳定性得到了提高。

目前酶蛋白工程主要集中在工业用酶的改造上。例如，洗衣粉中添加的枯草芽孢杆菌蛋白酶，是一种天然的丝氨酸蛋白酶，它能分解衣服上的血迹或汗渍类物质中的蛋白质等物质，从而使衣物洗净。但是这种酶易被漂白剂被破坏而失去活性，原因是 222 位的甲硫氨酸容易被氧化成砷或亚砷。利用目前的生物技术，将它用丝氨酸或丙氨酸替代后，酶的抗氧化能力大大提高，便可以与漂白剂混合使用了。

随着人们对酶催化本质、蛋白质晶体学、蛋白质化学的进一步了解和深入，可以设计和制造更多的新酶基因，满足生产需要。近年来，抗体酶的发展，打破了化学修饰和酶基因修饰的界限，结合免疫球蛋白的分子识别特性，应用免疫学、细胞生物学、化学、分子生物学等技术，可制备出具有高度底物专一性和特殊催化活力的新型催化抗体，这为酶的分子设计提供了一个新的思路。

总之，酶的修饰和改造技术在一定程度上弥补了天然酶的不足之处，使其更适合于工农业生产等方面需要。随着基因工程技术的发展，彻底改造、合成或模拟酶将逐步变成现实。

(六) 修饰酶的性质特征

1. 酶的热稳定性增强了 因为许多修饰剂分子中存在多个活性反应基团，常常与酶形成多点交联，相对固定了酶的分子构象，但如 PEG 等通过单点联结的修饰酶在热稳定性上无明显提高。
2. 消除抗原性作用 现在比较公认的是 PEG 和人血清蛋白在消除酶抗原性上效果明显，有些修饰剂在消除酶抗原性上没有作用。
3. 许多修饰酶在体内的半衰期延长了 因为酶经修饰后，增强了抗蛋白水解酶、抗抑制剂和抗失活因子的能力，并且对热稳定性提高了，这些均使其半衰期延长。
4. 修饰酶的最适 pH 范围均向有利于生理和临床应用范围变化 有利于它的使用。
5. 对最大反应速度和米氏常数的影响 大多数修饰酶的最大反应速度 V_m 没有变化，米氏常数 K_m 会增大，但修饰酶抵抗各种失活因子的能力和体内半衰期的延长，能够弥补 K_m 增大的缺陷，不影响修饰酶的使用价值。
6. 修饰酶对组织的分布能力有所提高 能在血液中被靶器官选择性地吸收。例如天然溶菌酶几乎不被肝细胞吸收，但溶菌酶和肌球蛋白来源糖肽交联后，再经唾液酸苷酶除去糖肽末端唾液酸，暴露出半乳糖残基后，就很快能被肝细胞吸收掉。

六、酶的固定化

酶是一种蛋白质，具有很多催化优点，但稳定性差，而且在催化结束后难以回收。为了适应工业化生产的需要，人们模仿生物酶的作用方式，将酶束缚在特殊的相上，让它既能保持酶的特有活性，又能长期稳定反复使用，同时又可以实现生产工艺的连续化和自动化。随着固定化技术的发展，作为固定化的对象不一定是酶，亦可以是微生物细胞或动植物细胞和各种细胞器。这在生产工艺上是一种变革，因为它使产品的后处理工艺大大简化，节省了成本和三废污染。自

1973年日本千田一郎首次在工业上成功应用固定化微生物细胞连续生产L-天冬氨酸以来,细胞固定化已取得了迅猛发展,近年来又从静止的固定化菌体发展到了固定化活细胞(增殖细胞)。

(一) 酶的固定化方法

酶的催化作用主要由其活性中心完成,酶蛋白的构象也与酶的活性密切相关。因此,制备固定化酶时,应尽量在温和条件下进行,避免破坏其活性的操作(高温、强酸、强碱等)。特定的酶要根据具体的应用目的选择特定的固定方法,已建立的固定化方法见图4-10。

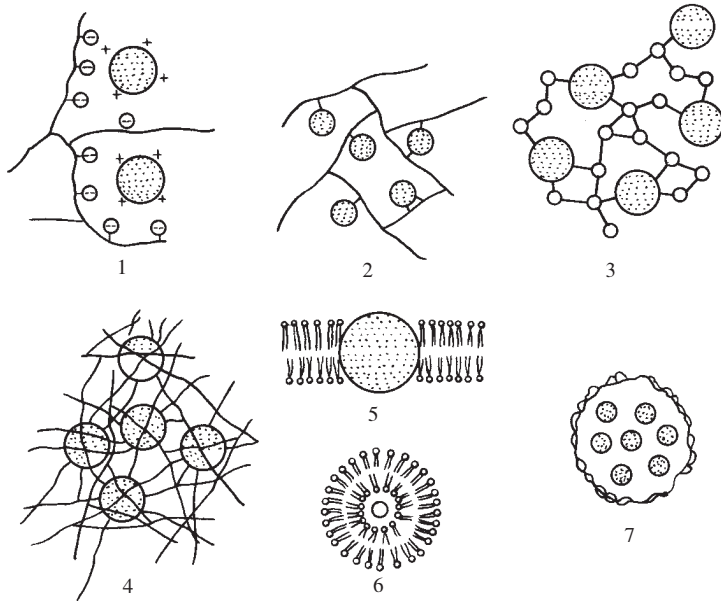


图4-10 酶固定化方法示意图

1. 离子结合 2. 共价结合 3. 交联 4. 聚合物包埋
5. 疏水相互结合 6. 脂质体包埋 7. 微胶囊

1. 载体结合法

(1) 物理吸附法。这是酶被物理吸附于不溶性载体的一种固定化方法,吸附的载体很多,有活性炭、石英砂、多孔玻璃、氧化铝、硅胶、磷酸钙、淀粉、谷蛋白、纤维素、葡聚糖、琼脂糖、聚丙烯酰胺等。物理吸附法具有不破坏酶活性中心和酶高级结构变化少的优点,若能找到适当的载体,这是简单的好方法。但是它有酶与载体结合力弱、酶易脱落等缺点。

(2) 离子吸附法。该法是通过离子效应,将酶分子固定到含有离子交换基团的固相载体上。常见的载体有DEAE-纤维素、CM-纤维素、DOWEX-50等。离子吸附法操作简单,处理条件温和,能得到酶活回收率较高的固定化酶,但酶与载体的结合力较弱,当离子强度高、缓冲液种类或pH发生变化时,酶容易脱落。

(3) 共价结合法。这是将载体有关基团活化、与酶分子上的功能团发生化学反应形成共价键的一种固定化方法,是研究得最多的固定化方法之一。可与载体结合的酶的功能团有 α 或 ϵ -NH₂, α 、 β 或 γ -羧基,巯基,咪唑基,酚基等,但参与共价结合的氨基酸残基应当是酶催化活

性的非必需基因，否则可能会导致固定后酶活力完全丧失。利用酶的巯基与载体进行结合在商业上具有十分重要的意义，因为该反应是可逆的，在还原条件下，可以把酶从载体上除掉，再换上新鲜的酶，这可以节约使用载体。与离子结合法或物理吸附法相比，该法反应条件苛刻，操作复杂，因采用了较激烈的反应条件，容易使酶的高级结构发生变化而破坏活性中心，所以操作时需注意。

(4) 金属的氢氧化物和氧化物。水不溶性过渡金属氢氧化物具有螯合氨基酸、肽和蛋白质等特性。已明确能用于酶固定的金属氢氧化物有钛（二价和四价）、锆（四价）和钒（三价）等，以钛（四价）的氢氧化物较好，它能与酶中的羧基、羟基和氨基结合。

2. 共价交联法 这是通过双功能或多功能试剂（交联剂），在酶分子之间或酶分子与微生物细胞之间形成共价键的连接方法。它与共价结合法的区别是它使用交联剂而不用载体，常用的交联剂有戊二醛、异氰酸酯、顺丁烯二酸酐和乙烯共聚物等。交联法的反应条件也较激烈，固定化的酶活回收率较低，但尽量降低交联剂浓度和缩短反应时间，会有助于固定化酶比活力的提高。

3. 包埋法 包埋法可分为凝胶网格型和微囊型。将酶或微生物包埋在高分子凝胶网格中的包埋法称为凝胶网格包埋型，将其包埋在高分子半透膜中的包埋法称为微囊型。包埋法一般不需要与酶蛋白的氨基酸残基起结合反应，较少改变酶的高级结构，酶活力的回收率较高，但它仅适用于小分子底物和产物的酶，因为只有小分子物质才能扩散进入高分子凝胶的网格，并且这种扩散阻力还会导致固定化酶动力学行为的改变和酶活力的降低。

(1) 凝胶网格型。采用明胶、卡拉胶、海藻酸钠或淀粉等天然高分子化合物作为包埋剂时，可以将酶直接与溶胶态的包埋剂混合凝胶化即可。但由于凝胶孔径不规则，总有一些大于平均孔径的，时间稍长时，酶也容易泄漏。因此，它常与交联法结合达到加固的目的，如先用明胶包埋，再用戊二醛交联等。

(2) 微囊型。利用各类型的膜将酶封闭起来，这类膜能使小分子产物和底物通过，而酶和其他的高分子不能通过。该法反应条件要求高，制备成本高。常用的微囊制备方法有界面沉淀法和界面聚合法。近年来的脂体包埋法是将酶包埋在由表面活性剂和卵磷脂形成的液膜内的方法，其特征是底物和底物的膜透过性不依赖于膜孔径的大小而仅依赖于对磷脂膜成分的溶解度，因此可加快底物透过膜的速度。成本低的包埋法是将酶包埋在合成的醋酸纤维素的微孔穴中的方法，具有酶结合的表面积大、有优良的抗微生物和抗化学试剂的性能。

(二) 细胞的固定化方法

细胞固定化免去了破碎细胞提取酶等工序，直接将能产生目的酶的完整细胞固定在载体上。因此，固定化后酶活基本没有损失，它还保留了细胞原有的多酶系统，对于多步催化转换的反应，优势更加明显，而且无需辅酶的产生。但在选用固定化细胞作为催化剂时，应考虑到底物和产物是否容易通过细胞膜，膜内是否存在产物分解系统和其他副反应系统，或者说虽有这两种系统，但是否可事先用热处理或 pH 调整等简单方法使之失效。细胞固定化的主要方法有用载体对细胞的包埋法和利用载体与细胞之间吸引力的吸附法两种。固定化细胞的制备方法类似于固定化酶的制备方法。

(三) 固定化酶（细胞）的性质

游离酶分子与底物相作用时通常以水溶液形式进行反应，可以充分接触，而酶被固定化后，

则处于载体特定的微环境中。由于载体的物理性质对酶与底物作用的影响，酶的性质发生了变化。

1. 酶活力的变化 酶经固定化后，酶分子的构象可能改变，导致了酶与底物结合能力或催化底物转化能力发生变化；载体的存在给酶的活性部位或调节部位造成某种空间障碍，影响酶与底物的作用；酶包埋于载体，底物必须扩散进入载体才能和酶分子接触，扩散速率的不同限制了酶与底物的作用。

2. 酶稳定性的变化 从有关报道来看，经固定化后，大多数酶的稳定性提高了，这对实际应用十分有利。固定化酶的稳定性常用半衰期表示，即固定化酶活力降为最初活力一半所经历的连续工作时间。迄今为止，人们还不能彻底阐明固定化酶稳定性变化的机制。

3. 最适 pH 的变化 氢离子在溶液和固定化酶之间的分配效应，对反应速度具有重要影响，如果酶反应产生酸或消耗酸时，pH 曲线会发生显著变化（曲线向右移动或向左移动），最适 pH 也会相应变化。

4. 最适温度变化 酶反应的最适温度是酶失活速度与酶反应速度综合的结果。在一般情况下，固定化后的酶失活速度下降，所以最适温度也随之提高。如色氨酸酶经共价结合后最适温度比固定前增高了 5~15℃。

5. 动力学常数的变化 酶固定于电中性载体后，表观米氏常数往往比游离酶的米氏常数高，而最大反应速度变小；而当底物与带有相反电荷的载体结合后，表观米氏常数往往减小，这对固定化酶实际应用是有利的。此外，在高离子强度下，酶的动力学常数往往几乎不变。

(四) 固定化酶（细胞）的评价指标

1. 相对酶活力 具有相同重量酶蛋白的固定化酶与游离酶的活力的比值称为相对酶活力，它与载体结构、颗粒大小、底物分子量大小及酶的结合效率有关。相对酶活力低于 75% 的固定化酶，一般无实际应用价值。

2. 酶的活力回收率 固定化酶的总活力与用于固定化的酶总活力的百分比称为酶的活力回收率。一般情况下，活力回收率应小于 1，如果大于 1，可能是由于固定化活细胞增殖或排除了某些抑制因素的结果。

3. 固定化酶的半衰期 即固定化酶的活力下降到为初始活力一半所经历的时间，用 $t_{1/2}$ 表示，它是衡量固定化酶操作稳定性的关键。其测定方法与化工催化剂半衰期的测定方法相似。

七、酶反应器

为适应酶的生物反应特点而设计制造的反应设备称为酶反应器。这种生物催化反应可以是单酶反应，也可以是增殖细胞内的多酶反应；可以是游离酶（细胞）反应，也可以是固定化酶（细胞）反应。由于生物催化剂的催化反应是非常多样化的，所以酶反应器的种类很多，见图 4-11。

(一) 酶反应器的基本类型

1. 搅拌罐型反应器 这类反应器的优点是造价低，装置简单，传质阻力最小。图 4-11 中分批式 (1)，连续流式 (2) 和 (3) 属于这种类型。它们都具有结构简单、温度和 pH 易控制、能处理胶体底物和不溶性底物及催化剂更换方便等特点。缺点是搅拌桨叶产生剪切力，容易将催化

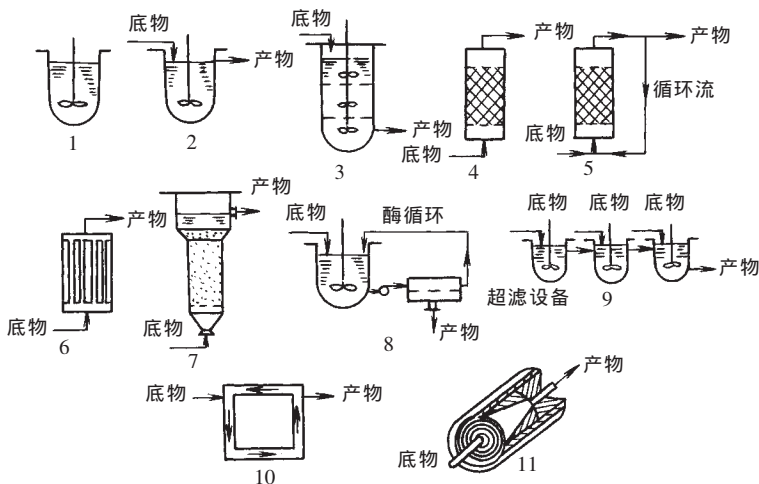


图 4-11 酶反应器的类型

1. 间歇式搅拌罐 2. 连续式搅拌罐 3. 多级连续式搅拌罐 4. 填充床(固定床)
5. 带循环的固定床 6. 列管式固定床 7. 流化床 8. 搅拌罐超滤器联合装置
9. 多釜串联半连续操作 10. 环流反应器 11. 螺旋卷式反应器

剂颗粒破坏。在连续流搅拌罐图 4-11 (2) 和 (3) 的液体出口处设置过滤器, 可以把催化剂颗粒保存在反应器内。也可将催化剂颗粒装在用丝网制成的扁平筐内, 作为搅拌桨叶及挡板, 从而使反应器中的颗粒不致流失。

2. 固定床反应器 将颗粒状、板状或纤维状的固定化酶(细胞), 填充在固定床(填充床)中的反应器叫做固定床型反应器, 图 4-11 中的 (4)、(5) 和 (6) 属于这种类型。反应液在反应器中的流动就如同一个活塞推进一样, 沿柱的方向底物和产物浓度是逐渐变化的, 但在同横切面上浓度是一致的。它具有单位体积的催化剂负荷量高、结构简单、容易放大、剪切力小、催化效率高等优点, 特别适合于无底物抑制的催化反应。缺点有: ①温度和 pH 难以控制; ②底物和产物会产生轴向分布; ③更换部分催化剂相当麻烦; ④柱内压降相当大, 底物必须加压后才能进入。具体使用时, 根据流动方向, 分为上行和下行两种。

3. 流化床型反应器 图 4-11 中 (7) 为流化床型反应器, 底物以一定的速度从下向上流过, 使固定化酶颗粒在流体中维持悬浮状态并进行反应, 这时的固定化颗粒和流体可以被看做是悬浮的均匀混合的流体。流化床反应器具有良好的传热与传质特性、不易被堵塞(当底物黏度较大时, 此优点更明显)、能处理粉状底物、压降较小等优点, 也很适合于需排气供气的反应。缺点是需要较高的流速才能维持粒子的充分流态化, 有时会导致粒子的机械破损。

4. 膜式反应器 这是利用膜的分离功能, 同时完成反应和分离过程的一类反应器。这类反应器包括平板状或螺旋卷型反应器、中空纤维膜反应器、转盘反应器、空心酶管反应器等。酶可以是游离或固定化方式存在与底物反应, 也可以直接将酶固定在固体膜上, 中空纤维反应器是数根醋酸纤维素制成的中空纤维构成, 其内层紧密光滑, 可截留大分子物质, 允许不同的小分子量物质通过, 外层是多孔的海绵状支持层, 酶(细胞)可以固定在海绵介质中, 这种反应器不仅能

承受 68 个标准大气压 (约合 6.8MPa) 以上的压力, 而且还具有高的膜装填密度 (单位体积反应器内的膜面积), 具有很好的工业应用前景, 但是当流量较小时, 容易产生沟流现象。

(二) 酶反应器的发展趋势

近几十年来, 酶工程技术有了长足的发展, 但是在已知的酶中已被利用的酶还是少数。目前工业上大规模应用的酶, 仅限于水解酶和异构酶两大类中的某些酶, 而且大多是单酶系统, 这就需要在生物反应器上花大力气。目前酶反应器的研制也在提高层次, 第二代生物反应器的研制, 主要包括以下几种类型: ①辅因子再生反应器; ②产物迅速移去的酶反应器; ③两相或多相反应器; ④多酶反应器。其中多相反应器在近几年来进展较快, 例如可以利用脂肪酶的特点来合成具有重要医疗价值的大环内酯和光学聚酯。就第二代酶反应器的整体水平来看, 多属实验室研究阶段, 仍待发展和提高。由于酶蛋白具有高度的分子识别功能, 固定化酶柱或酶管又具有能被重复使用的优点, 因而可以被广泛地开发成用于生产分析和临床化学检测的酶传感器。

(三) 酶反应器的设计原则

酶反应器设计的基本原则是通用和简单, 设计时要考虑以下因素: ①选择特异性高的酶或特殊生产率高的细胞, 以减少副产物的生成, 注意底物的酶促反应动力学以及温度、压力、pH 等操作参数对酶的影响。②反应器的类型及反应器内流体的流动状态及传热特性。③所需的生产量和生产工艺流程, 尽量提高产物的浓度, 尽量减少产品后处理的开支和总投资。

第二节 酶工程与食品加工

酶在食品工业中的应用十分广泛, 几乎涉及所有食品领域。例如, 酒类、乳品、焙烤食品、淀粉糖、果蔬制品、肉制品等加工过程的许多重要步骤均需依赖于酶的作用。

一、淀粉糖加工

以淀粉类物质为原料, 通过多种酶有序地协同作用可以加工得到不同种类的淀粉糖 (图 4-12)。在淀粉糖生产中有三种酶用量最大, 它们是细菌 α -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶和葡萄糖异构酶。

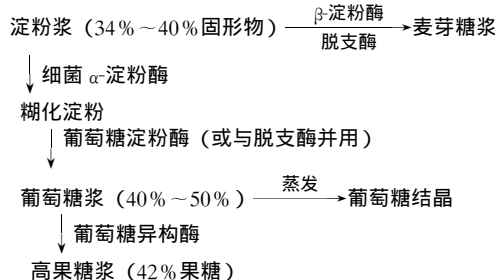


图 4-12 淀粉糖生产示意图

(一) α -淀粉酶

α -淀粉酶 (EC3.2.1.1) 为淀粉内切酶, 能随机水解直链或支链淀粉分子 α -1, 4-糖苷键生成

不同长度的寡糖，因此液化淀粉速度快，最终产物为 α -极限糊精和少量的葡萄糖及麦芽糖。细菌 α -淀粉酶热稳定性高，主要用于淀粉高温液化，作用条件一般为 85°C ， $\text{pH } 5.5\sim 7.0$ 。在淀粉液化工艺中应用的淀粉酶主要是从细菌中得到的，如来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的淀粉酶最适作用温度为 90°C ，当有 Ca^{2+} 存在时，能在 110°C 高温下短时间存活。 Ca^{2+} 是淀粉酶的稳定剂和激活剂。真菌 α -淀粉酶对热相当敏感，并且作用与淀粉后主要产生麦芽糖和其他低聚物，一般不用于液化工艺。

(二) β -淀粉酶

β -淀粉酶 (EC3.2.1.2) 是一种淀粉外切酶，在淀粉链非还原性末端水解 α -1, 4-糖苷键，产生麦芽糖。其最适作用 pH 为 $6.5\sim 7.0$ 。与 α -淀粉酶相同， β -淀粉酶也不能水解 α -1, 6-糖苷键，因此形成 β -极限糊精，麦芽糖的含量仅为60%。如果将 β -淀粉酶与脱支酶联合应用可将淀粉水解成麦芽糖。

(三) 葡萄糖淀粉酶

葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3) 也称淀粉葡萄糖苷酶，主要催化淀粉和寡糖的 α -1, 4-糖苷键水解，从分子的非还原性末端释放出 β -葡萄糖分子。此酶还可缓慢水解 α -1, 6-糖苷键和 α -1, 3-糖苷键，水解后生成DE值为 $97\sim 98$ ，葡萄糖含量为 $95\%\sim 97\%$ (W/W) 的葡萄糖浆。生成的葡萄糖浆也可以脱水得到结晶葡萄糖，或用于玉米高果糖浆的原料。淀粉葡萄糖苷酶价格较低，已经大规模用于淀粉加工工业中。在 $35\sim 60^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH } 4.5$ 下，可将 α -淀粉酶生成的糊精转变成葡萄糖。葡萄糖淀粉酶的不足之处是对 α -1, 6-糖苷键活性较低，这样要达到所需要的水解程度，要加大酶量或延长保温时间，或将该酶与脱支酶联用。

(四) 葡萄糖异构酶

在淀粉糖生产过程中葡萄糖异构酶 (EC5.3.1.5) 能够将葡萄糖转化成果糖，它是加工果糖和高果糖浆 (HFCS) 的重要酶类。能产生葡萄糖异构酶的微生物很多，主要有芽孢杆菌、链霉菌、密苏里游动放线菌 (*Actinoplanes missouriensis*) 等，该酶在绝大多数菌株细胞内产生，在 $55\sim 60^{\circ}\text{C}$ 和 $\text{pH } 7.5\sim 8.0$ 下作用效果良好。 Mg^{2+} 是葡萄糖异构酶的稳定剂和激活剂，木糖可用于这种酶的诱导。葡萄糖异构酶很适合以固定化形式使用，它是目前惟一以工业规模应用的固定化酶。

(五) 淀粉糖加工其他用酶

1. 转化酶 (EC3.2.1.26) 也称 β -D-呋喃果糖酶，来源于酵母菌株，可以将蔗糖水解生成转化糖，此产物由1:1混合的葡萄糖和果糖组成，比蔗糖甜些，主要用于果酱、糖果、人造蜂蜜等食品加工，可以起到防止蔗糖晶析的作用。

2. 脱支酶 包括异淀粉酶 (EC3.2.1.68) 和支链淀粉酶 (EC3.2.1.41)，能够专一作用于支链淀粉中的 α -1, 6-糖苷键，与其他淀粉酶作用可将淀粉彻底水解。将这些酶同葡萄糖淀粉酶一起使用，可以产生 $\text{DE} > 96$ 的葡萄糖浆；与 β -淀粉酶一起使用，可将液化后的淀粉浆转化成麦芽糖浆，麦芽糖的产量比 β -淀粉酶单独作用时显著增加。

二、乳品加工

乳制品加工过程中需要利用多种酶，例如乳糖酶、蛋白酶、脂肪酶、过氧化氢酶等，在乳糖

水解、干酪凝结、风味形成及牛奶保藏等方面发挥重要作用。

(一) 乳糖酶

乳糖酶 (EC3.2.1.23) 也称 β -D-半乳糖苷酶 (β -D-galactosidase), 广泛存在于桃、杏、苹果等植物及大肠杆菌、乳酸杆菌、酵母菌和霉菌等微生物中, 其作用是将乳糖分解形成葡萄糖和半乳糖。乳糖水解产物甜度增加, 溶解度比乳糖高 3~4 倍。高焕春等报道了乳糖酶在酸乳、奶粉、干酪及炼乳加工中的作用主要有以下几个方面。

1. 乳糖水解乳的加工 哺乳动物尤其是人在出生后肠道里具有乳糖酶活性, 但断奶后其他食物如牛乳等逐渐代替母乳, 乳糖酶活性逐渐减小甚至无乳糖酶产生, 因而引起乳糖不适应症。世界人口中 70% 大于 3 周岁的人群为乳糖不耐受, 食后会引起腹泻和胃肠不适。乳糖水解乳利用乳糖酶将乳中乳糖水解加工而成, 是乳糖不适应症的理想食品。

2. 防止乳糖结晶 乳糖溶解度较低, 在高浓度时会结晶析出, 一些浓缩乳清在贮运中会出现乳糖结晶, 还有一些浓缩乳制品如甜炼乳, 由于乳糖结晶析出影响产品外观和保藏。若在乳清中添加乳糖酶或在炼乳加工中添加 25%~30% 乳糖水解乳, 可以防止结晶现象, 并且增加产品甜度, 减少蔗糖用量。

3. 缩短乳凝固时间 用乳糖水解乳制造酸乳和奶酪时可以加快酸化过程, 有助于奶酪结构和风味的形成, 并且可缩短乳凝固时间, 奶酪凝固也更加坚实。

4. 乳清糖浆及半乳糖葡萄糖浆的制造及应用 乳清是加工干酪及干酪素的副产物, 世界年生产量约 9×10^7 t, 其中一半用于生产乳糖和乳清蛋白, 其余一半当废水排放, 不仅污染环境, 而且会流失有价值的营养物质。通过乳糖酶水解乳清, 使其中 4.5% 乳糖分解成半乳糖和葡萄糖, 所得称为乳清糖浆。乳清糖浆的甜度达到蔗糖甜度的 65%~80%, 溶解度增加 3~4 倍。若再经过葡萄糖异构酶作用, 将其中葡萄糖异构化生成果糖, 则称为半乳糖果葡糖浆, 其甜度与等浓度的蔗糖相当。水解乳清能够代替蔗糖作为甜味剂, 用于各种点心、饮料、糖果、焙烤食品、罐头食品及冰激凌加工。一些商品乳糖酶的性质和应用见表 4-1。

表 4-1 一些商品乳糖酶的性质和应用

来源	最适 pH	最适温度 (°C)	应用
<i>Kluyveromyces lactis</i> (游离形式)	6.5	40~50	乳清水解、动物饲料
<i>Kluyveromyces fragilis</i> (游离形式)	6.7	35~45	乳清水解、食品配料
<i>Aspergillus oryzae</i> (游离形式)	5.0	55	牛乳水解
<i>Bacillus</i> spp. (固定化形式)	6.5	60	乳糖酶水解产物作为双歧杆菌生长因子

(二) 凝乳酶

奶酪加工中一个重要的步骤就是要使液态乳转变成凝乳, 这个凝结过程是采用凝乳酶类 (EC3.4.4.3) 来催化完成的。乳中的酪蛋白以胶体状态存在, 其胶粒结构的外围为 K-酪蛋白, 中心为 α s1-和 β -酪蛋白酸钙。凝乳酶作用使 K-酪蛋白中苯丙氨酸和亮氨酸间的键的断裂使其水解, 酪蛋白胶粒成为亚稳态, 内部的 α s1-和 β -酪蛋白酸钙会凝聚成较大胶体聚合物沉淀出来形成凝乳。提高温度和增加 Ca^{2+} 浓度均可加快干酪凝胶结构的形成。

传统使用的凝乳酶是犊牛皱胃酶, 但是以犊牛为原料制取凝乳酶远远不能满足干酪生产需

要, 各国都在寻求新的凝乳酶资源, 研究发现微小毛霉、米曲毛霉及浅白隐球酵母 (*Cryptococcus albidus*) 均能产生凝乳酶, 微生物凝乳酶具有巨大的开发潜力, 其不足之处是有些酶热稳定性较高, 致使在乳制品中残留量升高。

(三) 转谷氨酰胺酶

转谷氨酰胺酶 (transglutaminase, EC2.3.2.13) 能够催化蛋白质中赖氨酸上的 ϵ -氨基和谷氨酸上 γ -羟酰胺基之间的结合反应, 并通过转谷氨酰胺作用形成共价化合物的聚合酶, 经过转谷氨酰胺酶处理过的蛋白质具有很好的理化特性和功能效价。该酶存在于动物、植物和微生物中, 已经发现肉桂链轮丝菌、茂原链轮丝菌、灰肉链轮丝菌均能产生转谷氨酰胺酶。目前该酶已广泛应用于鱼制品、面制品和乳制品等食品行业中, 在乳品中的应用有以下几个方面。

1. 用于奶酪生产 酪蛋白是转谷氨酰胺酶的良好底物, 在奶酪生产中, 经过转谷氨酰胺酶处理后, 使乳清蛋白与酪蛋白交联在一起, 从而提高奶酪产量。
2. 用于制备可食性包装材料等 乳中蛋白经过转谷氨酰胺酶处理后, 可制备可食性涂膜、包装材料和固定化载体, 提高产品外观和保质期。该酶还可作为干酪、冰激凌、奶酪等加工品的稳定剂, 使冰激凌成型不易溶化。
3. 用于炼乳生产 在加工炼乳过程中加入少量的转谷氨酰胺酶, 炼乳不易出现脂肪上浮和蛋白质颗粒沉淀现象。
4. 用于奶粉生产 在牛奶粉生产过程中, 添加该酶可以使产品奶粉不结块, 溶解性好, 不易氧化变质。
5. 用于酸酪乳生产 在制造酸酪乳过程中, 通过添加该酶可以防止某些食用胶的脱水收缩现象, 使食用胶的保水作用更加稳定。
6. 用于脱脂乳生产 脱脂乳经过转谷氨酰胺酶作用, 在适宜 pH、温度下或添加干酪凝乳酶均可使其形成凝胶, 可作为脂肪替代物用于生产低热值食品。

(四) 乳制品加工其他用酶

1. 过氧化氢酶 (EC1.11.1.6) 过氧化氢酶是一种氧化还原酶, 可将氢过氧化物分解成水和氧, 主要用于牛奶保藏。在一些发展中国家, 制冷设施不完善, 巴氏杀菌设备不健全, 为了保存牛奶, 在其中加入 33% 氢过氧化物 (1mL/L 牛奶), 这在减少病原微生物污染方面十分有效。在美国和欧洲允许以氢过氧化物取代加热对牛奶进行处理, 并可用于奶酪制造。添加过氧化氢酶的目的是将残存的氢过氧化物分解。
2. 溶菌酶 (EC3.2.1.17) 溶菌酶可作用于某些细菌细胞壁中 N-乙酰-D-葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸之间的 β -1, 4 糖苷键并将细胞壁溶解。当溶菌酶应用于奶酪制品或生产的奶酪的牛奶时, 表现出特殊的防腐作用和抗菌活性。通常每升牛奶添加 25mg 溶菌酶, 或每千克奶酪添加 30mg 溶菌酶可起到防腐作用。此外, 溶菌酶具有一定的凝乳作用, 可使牛奶以适宜速率形成奶酪。该酶在奶酪中非常稳定, 约有 80% ~ 90% 结合到奶酪中, 其效果甚至优于凝乳酶。目前, 美国、德国和意大利允许溶菌酶在牛乳及奶酪中使用。

溶菌酶可以添加到婴儿奶粉中, 以解决牛乳中溶菌酶含量低的问题 (母乳中溶菌酶是牛乳中的 3 000 倍), 溶菌酶利于乳酸菌生长, 并且促进婴儿肠道细菌双歧杆菌的增殖, 从而可以抑制污

染菌的繁殖。此外，溶菌酶能够促进婴儿胃肠内乳酪蛋白形成微细凝乳，有利于婴儿对牛乳的消化吸收。

3. 蛋白酶 蛋白酶能够将乳中的蛋白质分解产生氨基酸和肽类，在奶酪成熟和风味形成中发挥重要作用。并且能够缩短全脂奶酪成熟时间，改善低脂奶酪的风味和质地。

4. 脂肪酶 脂肪酶在乳品中的应用主要是在干酪生产中，用于加速干酪的成熟，缩短成熟时间，提高生产效率。现在的干酪生产一般都是同时添加蛋白酶和脂肪酶，以促进干酪的成熟，使干酪产生出其特有的风味。此外，还可将脂肪酶添加到奶油中，以增加奶油的风味。

各种酶在奶酪加工中及成熟过程中的应用情况见图 4-13。

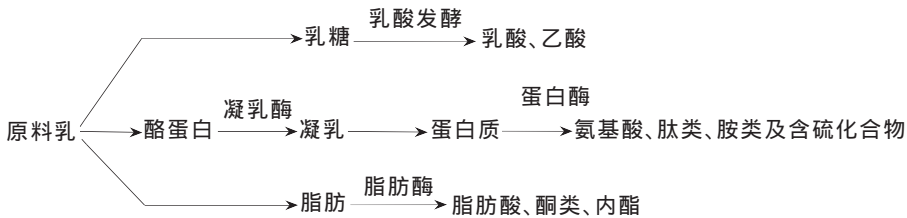


图 4-13 各种酶在奶酪加工中及成熟过程中的应用

三、果蔬加工

在果蔬类食品加工中经常使用酶制剂有：果胶酶、纤维素酶、柚苷酶、橙皮苷酶、蛋白酶等。

(一) 果胶酶

果胶酶 (EC3.2.1.15) 是指内切或外切聚半乳糖醛酸酶，存在于真菌、植物和某些细菌中，它们水解聚半乳糖醛酸残基的 α -1, 4-糖苷键形成小分子果胶，在果蔬加工中应用最多，主要用于果汁和果酒的澄清。

1. 果汁澄清 有些水果如山楂、草莓、柑橘、苹果、葡萄等含有丰富的果胶，在加工制汁过程中，由于果胶产生很高的黏性。影响压榨取汁和果汁澄清，通常在果实破碎后添加适量果胶酶，在适宜条件下作用一定时间，以分解原料中果胶，加速果汁的压榨和澄清。

(1) 苹果汁澄清。采用果胶酶处理，可以有效地解决苹果汁难于澄清和过滤的问题。处理条件一般为：pH 3.5，加酶量 0.025%，作用温度 30~40℃，澄清时间约 30~60min。罗仓学等研究认为在利用果胶酶法处理苹果汁时，若加入 0.3g/L 壳聚糖澄清效果更好。因为壳聚糖分子中存在氨基和羟基等活性基团，对果汁中各种悬浊物具有良好的吸附能力，从而形成絮凝而沉淀。

(2) 葡萄汁澄清。大多数品种的葡萄在破碎后所得的葡萄浆都显得浓稠黏滑，难以压榨。为了提高葡萄出汁率，缩短加工时间，获得澄清的葡萄汁，生产上已普遍应用果胶酶技术进行处理。葡萄汁液 pH 一般为 3.0~3.6，不必调节。加酶量为葡萄重量的 0.2%~0.4%。在 40~50℃ 条件下，搅拌处理 30min 左右；然后升温至 60~90℃，保温 10~30min。

(3) 猕猴桃汁澄清。据梁灵等报道, 猕猴桃汁果胶酶处理的最适条件为温度 45°C , pH 3.5, 果胶酶 100mg/kg , 在相同条件下用 0.6L 壳聚糖取代果胶酶也能取得相同效果。经过酶澄清的果汁置于 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 下保藏, 在 3 个月内能够保持稳定, 不产生二次沉淀。

2. 果酒澄清 在现代果酒酿造过程中, 已普遍使用果胶酶, 它对果酒质量和生产效率发挥重要作用。在葡萄酒生产中, 同果蔬汁加工相同, 果胶酶也是在果实破碎后加入, 用量为 $2.5\sim 4\text{mL}/100\text{L}$, 处理温度 $15\sim 35^{\circ}\text{C}$, 酶解时间为 $3\sim 10\text{d}$ 。经过果胶酶处理的原酒, 其自流汁含量明显增加, 也就是高档酒产量增加。同时原酒过滤速度加快, 色素浸出物增加, 能节约助滤剂皂土 30% 以上。邱雁临等在 1996 年对山楂酒澄清的研究表明, 在山楂汁发酵前加入 3% 果胶酶液, 处理温度 50°C , pH 4.0, 具有明显的澄清作用, 并且显著提高果酒透光率、出汁率。

3. 柑去囊衣 去囊衣柑橘罐头生产传统的方法是采用酸或碱处理除去囊衣, 这种方法在处理过程中对果肉会造成一定破坏, 耗水量也较大, 容易形成酸(碱)残留。利用黑曲霉产生的果胶酶、纤维素酶和半纤维素酶的混合物, 在一定温度、pH 条件下, 能有效去除囊衣, 处理效果优于酸碱法。

此外, 某些蔬菜、水果经过纤维素酶适当处理, 可使细胞壁膨胀软化, 提高其消化性并改进口感。在果蔬汁加工中, 纤维素酶与果胶酶一起使用可将汁液中纤维素类物质和果胶物质分解, 促进果汁的提取和澄清。

(二) 纤维素酶

纤维素酶 (EC3.2.1.4) 是一组包含果胶酶、蛋白酶、半纤维素酶和核糖核酸酶的多酶复合体, 具有很强的降解纤维素和果实细胞壁的功能。纤维素酶能够将植物纤维素水解为纤维二糖和葡萄糖, 使细胞内容物得以充分释放。纤维素酶的应用主要包括以下方面。

1. 果汁澄清 纤维素酶经常与果胶酶协同作用进行果汁澄清。在草莓果浆中添加适量的纤维素酶和果胶酶, 能有效地提高出汁率, 并且缩短压榨时间。

2. 板栗去皮 酶法去除板栗外皮能较好地保持果肉营养成分、形状、口感及色泽。据报道, 采用含纤维酶的去皮剂处理种皮(纤维素酶使用浓度在 $1\sim 1000$ 个活力单位/L), 使板栗果肉利用率提高 12%, 产品收率在 85% 左右。

(三) 柚苷酶

某些柑橘中含有苦味的物质柚苷, 从而会影响到其加工品的风味和质量。真菌柚苷酶能够将柚苷降解起到脱苦作用。在应用中, 一般应选用耐酸性强 (pH 2.8 左右)、酶活性高的柚苷酶制剂添加于果汁中, 在 $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ 下处理 $1\sim 2\text{h}$, 即达到脱苦效果。而柑橘罐头加工中需要进行加热杀菌, 所以需选用耐热性强的柚苷酶。

(四) 葡萄糖氧化酶

葡萄糖氧化酶能够将 $\beta\text{-D}$ -吡喃葡萄糖氧化形成葡萄糖酸, 同时消耗氧气。果汁中含有的 L-抗坏血酸在有氧情况下极易被氧化, 尤其在热加工过程中损失很大。在果汁加工过程中添加一定量的葡萄糖氧化酶, 可以通过它这种耗氧性质对 L-抗坏血酸起到保护作用。丁海标等 1995 年的研究表明, 每毫升橙汁中添加 1IU 葡萄糖氧化酶, 在 25°C 条件下对橙汁中的 L-抗坏血酸具有显著抗氧化作用。

四、鱼、肉制品加工

(一) 木瓜蛋白酶

木瓜蛋白酶 (papain) 来源于番木瓜, 是成分复杂的多酶体系, 主要包括木瓜蛋白酶、木瓜凝乳蛋白酶及番木瓜蛋白酶等, 其主要功能是催化蛋白质和肽类水解。其中木瓜肽酶 A 既有很强的蛋白水解催化活性, 又含凝乳和溶菌活性。目前应用较多的是通过它的蛋白分解活性, 在肉制品加工中用于肉的嫩化。

老龄动物肉由于肌原纤维蛋白含量较高, 口感比较粗糙坚硬, 随着畜龄增加, 肌原纤维蛋白交联数目和强度增加, 并且产生过量的结缔组织。木瓜蛋白酶可使肌原纤维蛋白溶解加快, 使肉松化和嫩滑, 改善肉的口感, 提高其营养价值, 促进其消化吸收。木瓜蛋白酶对于肌原纤维蛋白的作用在 40~70℃ 范围内活性最高。应用酶处理可能采取的方法有: 撒粉、浸泡、注射等。例如, 可以将木瓜蛋白酶与食盐淀粉等制成肉类嫩化剂, 在烹调时加入肉中。若使用木瓜酶水剂, 可以在动物宰杀前用静脉注射方法使老鹅、水牛等肉质欠佳的动物肉质得以改善。

另据研究报道, 胶原蛋白酶对于提高粗糙的肌肉或较老的动物肌肉的质量特别有益。Bailey 和 Etherington 研究认为, 降解肌原蛋白最有效的酶是胶原蛋白酶, 这种酶优先水解结缔组织蛋白, 而对其他蛋白的活极低。Cronlund 和 Woychik 发现从无色杆菌 (*Achromobacter*) 中得到的胶原蛋白酶比梭菌胶原蛋白酶对胶原的溶解能力更有效。

(二) 转谷氨酰胺酶

转谷氨酰胺酶能催化蛋白质之间发生交联反应, 在肉品加工过程中, 可应用转谷氨酰胺酶这一特性对低价值碎肉进行重组, 提高肉制品的外观及质构, 增加产品的附加值。具体方法是将碎肉与转谷氨酰胺酶在 10℃ 下混合即可得到重组碎肉产品; 或将碎肉与转谷氨酰胺酶、面粉、奶粉等原料混合, 制成汉堡包、肉丸、烧麦等风味食品。肉品加工中的副产品如机械脱骨碎肉、胶原蛋白、动物血等均可通过转谷氨酰胺酶加工再利用。

在鱼制品加工中, 当原料品质较差时 (如冻鱼), 可以通过添加转谷氨酰胺酶提高产品的凝胶强度。据 Ichihara 等报道了采用转谷氨酰胺酶与鳕鱼肉、食盐、土豆粉等混合加工鱼肉饼的方法。

五、油脂改良

脂肪酶 (lipase, EC3.1.1.3) 是油脂改良中的关键酶, 又称甘油三酯水解酶, 它能够在油-水界面上催化天然油脂水解, 生成脂肪酸、甘油和甘油单酯或二酯, 在有机相中进行酯的合成和酯交换反应。脂肪酶主要来源于微生物, 目前的研究表明约 65 个属的真菌、细菌及酵母能够产生脂肪酶。天然油脂由于其结构组成不同而具有不同的理化性质和营养价值, 利用脂肪酶的多种催化类型和脂肪酶作用的专一特性, 在适宜的反应条件下, 对天然油脂的结构进行改造, 能够合成具有一定营养功能和结构特征的结构脂 (structured lipid), 从而合理有效地利用有限的天然油脂资源, 并且提高其营养价值, 改善其功能特性, 促进高附加值产品的开发和应用。

近年来,国外在利用脂肪酶进行油脂改良方面的研究非常多,主要研究内容包括以下几个方面。

(一) n-3 长链聚不饱和脂肪酸的富集

目前人类膳食中两种重要的必需脂肪酸 n-6 和 n-3PUFA (聚不饱和脂肪酸) 比例为 1:10~20, 明显高于权威机构推荐的比例 1:3~10。为了提高膳食中 n-3PUFA 的比例, 有关人员已经对 n-3PUFA 功能食品的开发开展了大量的研究, 而且许多报道关注通过生物技术的方法, 例如采用微藻细胞培养和微生物发酵的方法生产 n-3PUFA, 以满足人类的需要。目前国外研究者利用生物技术的另一种重要手段——酶工程的方法对海鱼鱼油中的 n-3PUFA 进行富集以及合成富含 n-3PUFA 的甘油酯。n-3PUFA 在甘油酯中的富集和合成是通过脂肪酶催化的水解、酸解、醇解、酯化和酯交换等反应途径实现的。

水解是根据脂肪酶的选择性, 直接作用于鱼油, 将饱和及单不饱和脂肪酸从甘油三酯中分离出来, 而长链 n-3PUFA 仍然留在酰基甘油分子中。这样, 通过控制油脂的水解程度能够达到富集 n-3PUFA 目的。大量研究证明, 圆柱假丝酵母 (*Candida cylindracea*) 脂肪酶是鱼油水解最有效的脂肪酶。Tanlca 利用 *C. cylindracea* 脂肪酶可以使酰基甘油中 DHA 的含量比鱼油中的高出 3 倍; Shimada 采用分步水解方式使 n-3PUFA 在酰基甘油中含量达到 57.5%; Nalcada 使用固定化 *R. miehei* 脂肪酶对鲑鱼中长链 n-3PUFA 进行富集, 并且进行了大规模生产。Ju、Sridhar 和 Akoh 等记载了长链 n-3PUFA 在琉璃苣油、大豆油、葵花子油和花生油中富集的过程, 长链 n-3PUFA 甘油三酯比其自由脂肪酸和甲基酯形式更加稳定和更易消化。

醇解富集长链 n-3 PUFA 的机制与水解相同。Shimada 利用根霉 (*Rhizopus*) 脂肪酶催化月桂醇和鱼油中游离脂肪酸醇解, 使得二十二碳六烯酸 (DHA) 在产物中浓度达到 89%, 原游离脂肪酸中 71% 的 DHA 被回收。Yuet 等研究了在有机溶剂中利用甘油和长链 n-3 PUFA 合成甘油三酯的条件; He 和 Shahidi 从商品脂肪酶中筛选出酯化反应的最适脂肪酶为黏质色杆菌 (*Chromobacterium viscosum*) 脂肪酶, 在最适作用条件下产物合成率达 94.37%。

(二) 中(短)链脂肪酸酯的合成

中(短)链脂肪酸具有氧化稳定性、较低的熔点及黏度、代谢容易被吸收并且能够迅速提供能量等优点。因此, 近年来有关中(短)链脂肪酸甘油酯的合成研究也是油脂改良的重点之一。其中 Sn-2 和 Sn-1 β 中(短)链脂肪酸甘油酯的合成特别受到关注, 作为功能型和营养型甘油酯, 它能够提供容易吸收的脂肪酸, 改善人体代谢条件并且治疗某些疾病。

Lee 和 Alsk 利用 *R. miehei* 脂肪酶研究了花生油和辛酸在非溶剂系统中进行酸解的过程, 有 30% 辛酸被并入到甘油酯中。据 G.P. Mcneill 报道了应用多种脂肪酶将甘油与辛酸在异辛酸溶剂中酯化, 当使用铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、*R. miehei* 等脂肪酶时, 产物主要为辛酸甘油三酯; 当应用 *C. rugosa* 和 *R. delemar* 等脂肪酶时产物主要为辛酸甘油二酯。Ghosh 等应用 *R. miehei* 将椰子油或椰子亚油酸甘油酯同短链脂肪酸甲酯进行酯交换, 使产物中的短链脂肪酸从 12% 提高到 20%~25%。

(三) 可可脂替代品的生产

天然可可脂由于价格昂贵而限制了其在食品中的广泛应用, 有关利用廉价油脂酶催化生产可可脂替代品 (cocoa butter substitute) 的研究受到有关研究者的关注。1989 年 Macrae 等报道了可

可代脂合成过程。近年来，国内外对此进行了许多研究，主要方法为利用棕榈油的分馏产物 (POP) 与硬脂酸或硬脂酸乙酯由 Sn-1 (3) 脂肪酶作用进行酯交换，合成 POS (棕榈酰-油酰-硬脂酸酯) 和 SOS (硬脂酰-油酰-硬脂酸酯)，POS 和 SOS 均为可可脂的主要成分。据 Novo 的报道，应用 Novo Nordisk 公司的脂肪酶 Lipozyme 进行棕榈油和硬脂酸的转酯反应，所得油脂可应用于巧克力的制造。

(四) 塑性脂肪的合成

利用动物脂肪和蔬菜油以适当比例混合进行酯交换反应，在不同条件下可以得到从硬到软不同的塑性脂肪 (plastic fat)，产物随饱和脂肪酸酯含量的改变，熔点有一定变化，塑性范围 (固体酯含量) 在 15%~35% 的塑性脂肪通常涂抹性能良好。

Faglia、Graille、Lo 和 Seriburi 等以高熔点动物脂肪 (牛油或猪油) 或棕榈酸硬脂酸酯与高油酸的葵花子油、大豆油或蔬菜子油为原料，在米黑毛霉 (*Mucor miehei*)、地霉属 (*Geotrichum*)，假丝酵母属 (*Candida*) 脂肪酶催化下进行酯交换合成塑性脂肪，其特征与人造奶油很相近。

六、酒的酿造

(一) 啤酒酿造

啤酒酿造中需要应用多种酶 (图 4-14)。

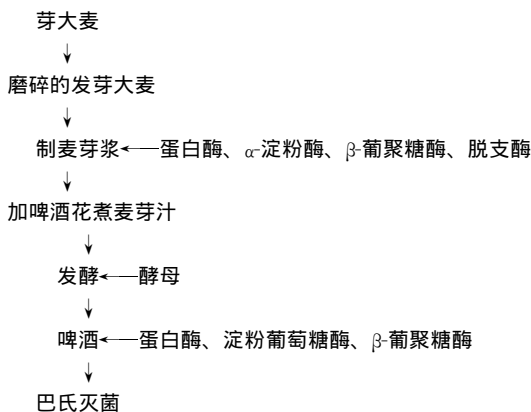


图 4-14 酶在啤酒酿造中的应用

1. 淀粉葡萄糖酶和 β -葡聚糖酶 通常在发酵后加入，前者是为了降解残留的糊精，以保证啤酒的最高乙醇含量，但在酿制鲜啤酒中不加淀粉葡萄糖 (苷) 酶，因为鲜啤酒不经过巴氏杀菌，添加的酶将存留在啤酒中不能除去。 β -葡聚糖酶起到分解 β -葡聚糖调节啤酒精度的作用，并且有助于啤酒过滤。

2. 蛋白酶 蛋白酶分别在制浆和调理过程中加入，经常使用的蛋白酶为木瓜蛋白酶。啤酒中的蛋白质与多酚、碳水化合物容易形成复合物，并且产生不溶性胶体沉淀，造成啤酒混浊。用木瓜蛋白酶对冷冻贮存中的啤酒进行处理，降解造成啤酒混浊的蛋白质及其复合物，

保证啤酒在冷冻贮存中的高清晰度。同时，由于木瓜蛋白酶的作用产生了更多的多肽和氨基酸，能够起到改善啤酒品质的作用。研究还表明，木瓜蛋白酶能显著提高啤酒泡沫覆盖度。

3. 葡萄糖氧化酶 作为新型生物去氧剂，在啤酒中添加的主要作用是通过与啤酒中的葡萄糖生成葡萄糖酸，除去啤酒中的溶解氧和瓶颈氧。因此葡萄糖氧化酶对防止啤酒老化，保持啤酒原有风味，以及延长保质期有显著效果。

(二) 白酒和酒精的生产

白酒和酒精的生产通常以含淀粉物质（如高粱、玉米、薯类等）为原料，利用耐高温的 α -淀粉酶将淀粉液化，再由葡萄糖淀粉酶继续作用形成可发酵的葡萄糖，最后通过酵母菌的酒精发酵作用将葡萄糖转化形成酒精。在白酒和酒精酿造过程中除了 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶两种主要酶制剂外，其他酶也发挥重要作用。

1. 纤维素酶 白酒酿造所用的原料中，纤维成分较多，尤其采用固体发酵工艺生产白酒，其原料中纤维素含量更多（填充料部分），大部分纤维素成分因为转化不了而被浪费掉。据宋国安研究，使用纤维素酶后，可同时将淀粉和纤维素转化为糖，增加了可发酵糖含量，再经酵母分解转化为酒精，能够提高出酒率 3% ~ 5%，酒体质量纯正，淀粉和纤维素利用率高达 90%。

2. 酸性蛋白酶 马加军等研究了酸性蛋白酶应用于小米发酵的浓香型酒时具有以下作用：①可加速蛋白质降解及增加氨基酸含量，促使酒中总酸总酯明显提高，从而强化香味物质的形成。②促使吸附的淀粉酶解脱出来，增进了淀粉的糖化过程，使出酒率提高 1.5% ~ 2.0%。

3. 脂肪酶 在酿酒工业中，脂肪酶通过催化有机酸和醇合成酯类增加浓香型曲酒的芳香成分。浓香型酒主体香气成分是乙酸乙酯，它的含量是衡量曲酒质量的重要指标。近年来，利用脂肪酶的酯化特性合成香酯的研究已有不少报道。卢进珩将根霉 (*Rhizopus*) 应用在大曲浓香型白酒中，产生的脂肪酶使乙酸乙酯含量有了明显提高，酒的口感有了较大改善。吴衍庸等在研究中发现红曲霉、根霉等许多菌株具有较强的合成乙酸乙酯的能力。

七、焙烤食品

焙烤食品加工工艺过程见图 4-15。

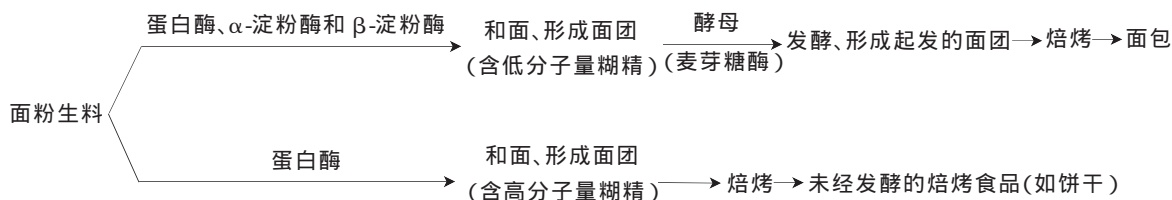


图 4-15 焙烤食品加工过程示意图

(一) α -淀粉酶和 β -淀粉酶

与焙烤食品加工过程有关的酶主要为 α -淀粉酶和 β -淀粉酶，两者协同作用使淀粉糖化生成葡萄糖、麦芽糖和含有 1,6-糖苷键的低分子寡糖。酵母麦芽糖酶再将麦芽糖分解为可发酵的葡萄糖并产生气体。小麦粉中 β -淀粉酶含量和活性基本上能满足焙烤要求，但是由于高精度加工使得小麦粉中 α -淀粉酶损失很多、含量较低，因此产生的糊精浓度较低，最终形成的气体减少，加工出的面包体积小、质量差。所以面包加工通常需要补充外源 α -淀粉酶。发芽的小麦粉中 α -淀粉酶活力高，在面包专用粉及面包冷冻面团中添加适量麦芽粉可弥补未发芽小麦粉中 α -淀粉酶不足。一般小麦中 α -淀粉酶热稳定性好，在烘烤过程中它仍然继续作用产生糊精，使得面包变得很黏，细菌 α -淀粉酶更为耐热，用于面包加工也会产生相同问题。而真菌 α -淀粉酶，如米曲霉 α -淀粉酶在 60℃ 以上失活，可以防止淀粉过度糊化，同时可赋予面包良好的组织质量和良好的色泽，延长货架寿命。添加葡萄糖淀粉酶能够获得足量的葡萄糖供酵母发酵产气。Przybyt 和 Sugier 报道由于葡萄糖淀粉酶比小麦面粉的 β -淀粉酶热稳定性更高，在烘烤中仍然保持了酶活，可以对 α -淀粉酶产生的糊精进一步水解。

(二) 蛋白酶

大量研究指出，将蛋白酶添加到面粉中可以缩短和面时间，改善面团黏弹性，调节面团和面粉的面筋强度，改良面包的口感和质量。Taeufel 报道蛋白酶和淀粉酶结合使用可以提高蛋白酶作用的有效性。在饼干制造中，需要含有高分子量糊精以及含有高水解程度面筋的面粉，以便有足够的弹性利于加工。但许多面粉不具备这种性质，而且蛋白酶活性很低，所以要外加蛋白酶来降解面筋，提高面筋的水解程度。例如，使用枯草杆菌产生的热稳定性内肽酶，能够改善面团流变性质，增加面团的弹性，这样在饼干加工过程中可将面团铺得很薄。Sprossler 及 Taeufel 研究表明，应用细菌蛋白酶和木瓜蛋白酶可降低稀面糊的黏度，提高其处理性能，缩短焙烤时间。Matz 和 Pylar 报道了在饼干生产中利用米曲霉蛋白酶可增加面团的伸展性，并提高面团的操作性能和产品质地。

(三) 其他酶类

1. 葡萄糖氧化酶 葡萄糖氧化酶是改善面包品质的新型酶制剂，对面团特性、面包体积和内部结构具有显著的改良作用，作用效果优于溴酸钾。但是用量过大会造成过度氧化，面筋过强，并恶化面团性质。

2. 脂肪氧化酶 脂肪氧化酶在焙烤工业中已经被应用很长时间了，其作用是：脂肪氧化酶通过氧化面粉中的胡萝卜素起到增白作用。此外，脂肪氧化酶可作为一种面团调节剂，用于增加面团的混合耐性和面团的起发体积。但也有报道认为，脂肪氧化酶可能引起芳香成分的损失，导致异味物质的形成。

第三节 酶工程与食品添加剂

一、高甜度甜味剂

(一) 阿斯巴甜

阿斯巴甜 (aspartame) 的化学组成为 L-天冬氨酰-L-苯丙氨酰甲酯 (APM)，是由天冬氨酸

和苯丙氨酸形成的二肽化合物。APM 的甜度是蔗糖的 180~200 倍，口感清爽，甜味特征优良，但是对热不够稳定，不适于在需要高温加热的食品中应用。

生产阿斯巴甜的关键在于两种原料——L-苯丙氨酸和天冬氨酸的生产。这两种原料可以通过发酵的方法生产，也可以采用酶法合成，Kenzo 发现由地霉属、从梗孢属、共头霉属、内孢霉属、曲霉属等菌株产生的苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 对肉桂酸具有较高的稳定性，可以催化肉桂酸与氨基供体生成高产量的 L-苯丙氨酸。Yamada 等研究了来自黏红酵母 (*Rhodotorula glutinis*) 的 PAL 的诱导产生条件以及酶的作用条件。结果表明：最佳的肉桂酸浓度应低于 60mmol/L，在 pH 为 10，氨为 7.5mol/L 条件下，可得 L-苯丙氨酸 16.5g/L，转化率为 70%。与原有的发酵法生产 L-苯丙氨酸相比，酶法合成及其纯化具有工艺步骤少、生产能力较强和投资强度较低等优点，因此将会成为有效的 L-苯丙氨酸合成途径。

延胡索酸是邻苯二甲酸酐生产的废料，通过天冬氨酸酶氨化可将延胡索酸转化为天冬氨酸。研究发现活性较高的天冬氨酸酶生产菌有：芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、埃希氏菌属 (*Escherichia*)、变形菌属 (*Proteus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 等。法国 Orsan 公司利用天冬氨酸酶生产菌——假单胞菌属，由延胡索酸制取天冬氨酸，产酸率达到 95% 以上。

(二) 三氯蔗糖

三氯蔗糖 (sucralose) 又称 4, 1', 6'-三氯半乳糖，最先由英国 Tate & Lyte 公司于 1976 年研究成功的，现已通过美国 FDA 批准并投入市场。在欧美食品市场，三氯蔗糖被广泛应用于糖果、巧克力、饮料、糕点等诸多食品中。三氯蔗糖甜味特征近似于蔗糖，其甜度是蔗糖的 400~800 倍，产热量极低，对光、热、pH 均很稳定，不参与人体代谢，安全性较高，因此是一种很有发展前途的高度甜味剂。Tate & Lyle 公司开发了酶-化学法生产三氯蔗糖的方法，该方法有两条路线。

1. 葡萄糖-蔗糖路线 首先利用芽孢杆菌属的菌株在 30℃ 下发酵葡萄糖，生成葡萄糖-6-乙酸，然后由枯草杆菌产生的 β -果糖基转移酶作用于葡萄糖-6-乙酸与蔗糖的混合物生成蔗糖-6-乙酸、蔗糖-6-乙酸与由五氯化磷和 DMF 制成的 Vilsmeier 试剂反应，即可得到 4, 1', 6'-三氯-4, 1', 6'-三脱氧半乳糖蔗糖五乙酸。该五乙酸脱去乙酸基后，即得产物三氯蔗糖。

这种方法的起始原料仅为蔗糖及葡萄糖，价廉易得，但是该路线步骤较多，其中发酵生成葡萄糖-6-乙酸这步反应价格较高，而且提纯蔗糖-6-乙酸又较困难，因此大规模生产时成本较高。

2. 棉子糖路线 棉子糖广泛存在于甜菜和棉子等许多植物中，它也可以由 α -半乳糖苷酶催化半乳糖和蔗糖的饱和溶液合成。棉子糖在氧化三苯膦的存在下，用亚硫酸氯氯化生成 4, 1', 6', 6''-四氯-4, 1', 6', 6''-四脱氧半乳糖棉子糖庚乙酸。该庚乙酸经脱乙酸作用后，即可生成 4, 1', 6', 6''-四氯-4, 1', 6', 6''-四脱氧半乳糖棉糖 (TCR)，TCR 在 30℃ 下，通过 α -半乳糖苷酶水解生成三氯蔗糖。

棉子糖过程较为简单，中间产物提纯相对容易，而且反应过程中应用的 α -半乳糖苷酶又是一种工业上应用较多的商品化酶。但是该路线的原料棉子糖尚未有大量的商品供应，需要从甜菜及棉子中提取或由半乳糖和蔗糖合成。此外，该路线中 TCR 酶水解反应进行得比较缓慢也是一个有待解决的问题。

二、5'-鸟苷酸和 5'-肌苷酸

5'-鸟苷酸 (5'-GMP) 和 5'-肌苷酸 (5'-IMP) 与味精按一定比例复配后可得超鲜味精, 也称为强力味精, 其鲜味、风味及生产成本均优于味精。

5'-核苷酸可通过酶法水解酵母中 RNA 制取。自 1975 年以来, 在日本大约 50% 的 5'-核苷酸采用酶法水解生产。5'-鸟苷酸 (5'-GMP) 和 5'-肌苷酸 (5'-IMP) 的酶法合成过程见图 4-16。

酵母细胞 RNA 含量很高, 在其生长的对数期初期, 采用热碱溶液提取 RNA, 再将 RNA 沉淀和干燥。RNA 在氢氧化钾溶液中, 在 130℃ 下加热 3~4h, 进行化学水解, 即可以产生核苷酸。核苷酸还可以通过再通过 5'-核酸酶或外切核酸酶的酶解获得。再经过从腺苷到鸟苷的脱氨基作用, 使核苷酸磷酸生成 5'-IMP 和 5'-GMP。

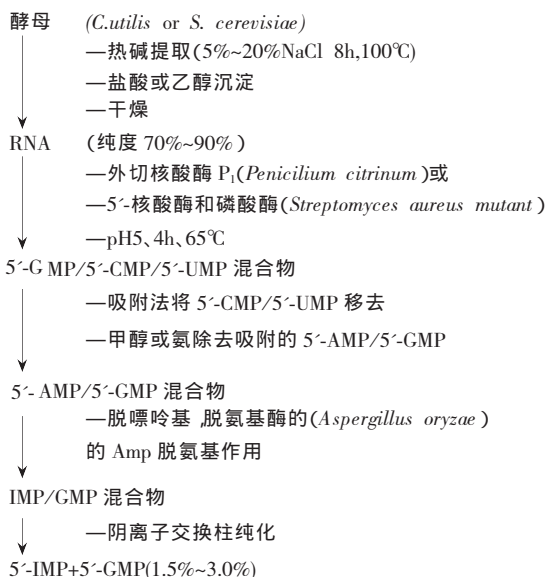


图 4-16 酶法合成 5'-核苷酸示意图

三、单甘酯

单脂肪酸甘油酯 (monoacylglyceride, MAG) 简称单甘酯, 是一类重要的非离子型表面活性剂。它含有一个亲油的长链烷基和两个亲水的羟基, 因而具有良好的表面活性, 可以作为乳化剂应用于食品、化妆品、医药等领域。近来的研究发现, 某些单甘酯表现出一定的抗菌特性, 这使得单甘酯研究和开发具有重要的应用价值。例如月桂酸单甘酯, 具有广谱抗菌性, 而且安全性高、性能稳定, 同时表面活性也较强, 目前已经在美国、德国、日本实现工业化生产, 并作为食品防腐剂投放市场。

(一) 单甘酯酶法合成的基本方法

目前单甘酯的工业化生产主要采用化学法。化学法合成单甘酯通常产率低、能耗高、产品色泽深而且有异味。为了获得较高质量和产量的单甘酯, 近年来, 人们开始探索以脂肪酶为催化剂, 在较低温度下合成单甘酯的新途径。酶法合成单甘酯具有许多优点, 如反应条件温和、能耗低和产品纯度高, 国内外已经对其进行了大量的相关研究, 但是仍然存在单甘酯产率较低, 合成所用设备结构、溶剂系统以及操作过程过于复杂等不足之处, 目前多数研究还处于实验阶段, 没有实现商业化生产。

国内外的研究者以天然油脂、脂肪酸和甘油等为原料, 利用生物催化剂脂肪酶, 在有或无有机溶剂体系中, 通过油脂水解或醇解、脂肪酸与甘油酯化和甘油解等多种反应途径合成单甘酯。脂肪酶在有机相中合成单甘酯的途径主要有如下几种。

1. 水解法 指天然油脂或三甘酯通过水解作用生成单甘酯的过程。水解法最主要的问题是MAG产率较低,原因是每产生1molMAG则生成2mol脂肪酸,脂肪酸抑制酰基转移从而阻止水解反应继续进行。

2. 酯化或转酯反应 指甘油与脂肪酸或脂肪酸酯通过酯化或转酯反应产生单甘酯的过程。酯化或转酯反应的关键是控制初步酯化产品MAG不被进一步酯化成双酯或三酯,所以生成的MAG应及时从反应体系中分离出去,以提高MAG产率。

3. 甘油解法 指以天然油脂或三甘酯和甘油为底物合成单甘酯的过程。甘油解反应具有最高理论产率,因为每1molTAG(三甘酯)消耗2mol甘油,同时能够产生3molMAG。不同油脂甘油解的最佳反应温度见表4-2。

表4-2 不同油脂甘油解的最佳反应温度

油 脂	牛脂	猪脂	乳脂	棕榈酸脂	椰子油	橄榄油	菜子油
单甘酯最大收率(%)	76	69	80	86	77	90	77
最佳温度(℃)	42	30	32	40	30	10	5

目前,合成单甘酯的微生物脂肪酶主要有:胰酶(pancreatic lipase)、玫瑰假丝酵母(*Candida rugosa*)脂酶、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)脂酶、黏质色杆菌(*Chromobacterium viscosum*)脂酶、米黑毛霉(*Mucor miehei*)脂酶等。根据以往的研究,在诸多脂肪酶中,假单胞菌脂肪酶催化合成单甘酯的能力较高,而目前国内在此领域中的研究则以国产猪胰脂肪酶为多。

(二) 单甘酯的酶法合成研究进展

近年来,国内外油脂工作者对单甘酯的酶法合成进行了大量的研究,这些工艺对单甘酯合成的工艺、脂肪酶和溶剂系统的选择、固定化脂肪酶的应用、如何提高产物得率和纯度等方面存在的问题提出了不同的解决方法。

据黄显慈报道,外国学者以月桂酸、月桂酸甲酯、棉子油、三月桂酸甘油酯等为酰基受体,采用固定化脂肪酶进行1(3)-单甘酯的研究。在有机溶剂(水含量小于2%)中,产物单甘酯很稳定,但是甘油与有机溶剂很难混溶,通过把甘油吸附于硅胶上制成叔丁基甲酯的悬浮液,能够有效地解决甘油与酰基供体混溶问题。此外,当以天然油酯为酰基供体与甘油发生甘油解反应时,产物往往包括1(3)-单甘酯和双甘酯、2-单甘酯,还有未反应的三甘酯。为了获得较高含量的单甘酯,使产物通过分离器而分离,在特定的温度下,选择特定的溶剂(例如乙醇:己烷=1:1),可以使1(3)-单甘酯在分离器中沉淀并结晶析出,而其他化合物仍保留在溶液中,溶液再循环进入反应器中,并进一步转化为1(3)-酰单甘酯。采用这种方法,当棉子油与甘油反应48h后,单甘酯产率达到83%~90%,产物中1(3)-单甘酯含量达96%,而用三月桂酸甘油酯为酰基供体时,产物纯度高达98%。我国的邵丽文也报道了脂肪酶催化连续制取高纯度单甘酯的方法。在含有分散脂肪酶的含水甘油酯相之上,设置溶解了脂肪酸的非极性溶剂相,使酯化反应在两相的界面上进行生产单甘酯,将非极性溶剂相逐次取出冷却,并使溶解于其中的单甘酯析出,然后将残液返回至酯化反应体系中,从而制得纯度达95%的单甘酯。

彭立凤、刘新喜研究了以CaCO₃粉末为载体吸附法固定化脂肪酶的方法,并且利用固定化酶催化棕榈油固相甘油解反应合成单甘酯工艺条件。结果表明,该固定化酶很容易从反应体系中回收,

重复使用 5 次 酶活保留 73.37%。刘新喜、彭立凤以蛋壳作载体固定化脂肪酶催化棕榈油甘油解合成单甘酯 单甘酯最高含量达到 44.2% ,产率为 83% ,该固定化酶使用 6 次后活力仍保留 70%。

彭立凤、谭天伟对反胶团体系中猪胰脂肪酶催化棕榈油水解合成单甘酯的工艺进行了研究,以 Span-20 为表面活性剂,异辛烷为有机溶剂,在适宜条件下反应 1.5h,单甘酯的含量最高可达 34.51% ,此时单甘酯产率为 84.31%。

彭立凤、谭天伟以猪胰脂肪酶为催化剂在无有机溶剂体系中,由牛油通过甘油解反应可合成单甘酯,在一定条件下反应,单甘酯含量最终可以达到 28.72%。他们还研究了以猪胰脂肪酶为催化剂,在无有机溶剂体系中,由棕榈油通过甘油解反应合成单甘酯,单甘酯在产物中的含量可达到 30.93%。与有机溶剂乳化体系相比,无有机溶剂体系可以减少产品污染,产物产率高,不需要后处理,是一种有前途的合成单甘酯的方法。

高修功、章克昌等对无溶剂体系中脂肪酶催化棕榈油的甘油解合成单甘酯进行了研究,发现温度对单甘酯的产率起关键作用。反应存在一临界温度,低于临界温度时单甘酯的平衡浓度高于 60% ,而高于临界温度时单甘酯含量只有 30% 左右。夏咏梅、章克昌从富油土壤中分离、筛选并优育出一株铜绿假单胞菌,发酵生产出铜绿假单胞菌脂肪酶 PJW,并以此为催化剂,在无溶剂体系中通过棕榈油甘油解合成了单甘酯。

四、β-环糊精

环糊精 (cyclodextrin) 是指由 6~9 个 D-吡喃葡萄糖单元通过 α -1,4 糖苷键连接形成的“锥筒”状分子化合物,相应于 D-吡喃葡萄糖的分子数,分别称为 α -、 β -、 γ -和 δ -环糊精,具有腔内亲油腔外亲水的独特结构,这一独特结构使其在医药、食品、化妆品等领域显示出重要应用价值。例如应用于某些食品或添加剂,具有增强稳定性,防止氧化和消除异味等功能。

(一) 环糊精葡萄糖基转移酶的性质和作用

环糊精葡萄糖基转移酶 (cyclodextrin glycosyl transferase, CGTase) 是一种具有催化功能的多糖类合成酶,它可以在分解淀粉的同时将开链糊精环化形成环糊精。1939 年, Tilden 和 Hudson 等发现软化芽孢杆菌 (*B. macerans*) 分泌的酶能从淀粉生成环状糊精。现已发现,可以产生 CGTase 的细菌有软化芽孢杆菌、环状芽孢杆菌 (*B. circulans*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*B. stearothermophilus*)、巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*) 等芽孢杆菌和肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 等无芽孢的细菌,其中软化芽孢杆菌和嗜碱芽孢杆菌已在工业生产中使用。表 4-3 是不同菌种生成的 CGTase 的性质。

表 4-3 不同来源的 CGTase 的性质

来 源	分子量	最适 pH	最适温度 (°C)	pH 稳定范围	温度稳定范围 (°C)	等电点	对淀粉作用主产品
<i>B. subtilis</i> No.313	64 000	8.0	65	7.0	50	7.1	γ -CD
<i>B. circcelans</i> C ₃₁	103 000	5.5	60	5.5~9	50		
<i>B. alkalophilus</i>	75 000	6.0	50	6~10	50		
<i>B. coagulans</i>	65 000	6.0	70	5.5~9.5		4.6	
<i>B. stearothermophilus</i>	68 000	6.0	70	7.0~9.2	50	4.5	γ -CD

(续)

来源	分子量	最适 pH	最适温度 (°C)	pH 稳定范围	温度稳定范围 (°C)	等电点	对淀粉作用主产品
<i>B. stearothermophilus</i> SE-4	80 000	6.0	75	5.5~9.5	70		γ -CD
<i>B. macerans</i>	67 000	5.4~5.8	60	8.0~10		5.4	γ -CD
<i>B. macerans</i>		5.0~5.7	55				γ -CD
<i>B. lentus</i>		6.5~8.5	45~55				$\beta > \gamma > \alpha$
<i>K. pneumoniae</i>		5.2	70~75	6.0~7.5	45	10	α -CD
<i>B. megaterium</i>		5.0~5.7	55	5.0~8.8	55	11	β -CD
<i>B. sphaeroides</i> E ₁	114 000			6~8	50~70	4.3	$\beta > \gamma, \text{no } \alpha$

由表 4-3 可知, CGTase 的来源不同, 酶的性质差异也很大。由软化芽孢杆菌生成的环糊精以 α -环糊精为主, 而巨大芽孢杆菌分泌的酶生成 β -环糊精较多, 由枯草杆菌生成的 CGTase 则以 γ -环糊精为主。张心平对嗜碱芽孢杆菌 (*B. alkalophilus*) NK₂₃₁ 产生的 CGTase 进行了研究, 发现该酶具有两种活性: 其一能将淀粉分解为大约由 6~12 个葡萄糖组成的糊精, 称淀粉糊化活性; 其二能将糊精分子的首尾葡萄糖基连接, 形成非还原性的环状糊精, 称环化活性。

(二) 环糊精葡萄糖基转移酶的固定化

自 1976 年从土壤中分离到嗜碱性芽孢杆菌以来, 环糊精进入了大规模的工业化生产。1977 年, 开始了对固定化 CGTase 的研究。固定化环糊精葡萄糖基转移酶制备环糊精具有固定化酶的一般优越性, 即酶可以重复使用、环糊精产率高, 并能够实现连续操作等。近年来相关的报道很多, Nakamura 用离子交换树脂作载体并使用固定化 CGTase 来制备 β -环糊精; Hashimoto 等人采用大孔树脂 IRA-93 和 HN-11-22 作载体, 进行了固定化酶环糊精连续化生产研究; Okada 等人用明胶、烷基胺、多孔玻璃作载体, 崔汉钧等用魔芋葡甘露聚糖作载体, 对 CGTase 的固定化进行了研究; 田晖应用甲醛活化的壳聚糖作为载体, 成功地固定了 CGTase; 朱伯儒等分别以球形纤维素阴离子交换剂和戊二醛处理过的壳聚糖作载体, 对 CGTase 的固定化进行了研究。壳聚糖具有机械性能良好、化学性质稳定和耐热性好等优点, 特别是其分子中的氨基, 既易于与酶共价结合, 又可络合金属离子, 使酶免受金属离子的抑制。它的来源丰富、制备简单、成本低廉, 同时易于通过接枝而改性, 因而是一种有待开发的固定化酶的良好载体。

从已有的研究结果来看, 各种方法都存在不足之处。离子交换吸附法虽效果较好, 但价格较高。物理吸附是最直接的固定化过程, 制备简单, 成本较低, 往往酶活力较高。迄今为止, 人们已成功运用硅胶、硅藻土、大孔氧化铝、多孔玻璃等作为载体固定 CGTase, 但是存在酶脱附的问题。共价键结合法制备过程复杂, 成本较高, 酶活力回收率低。虽然各种固定化方法的研究取得了一定成效, 但是, 要运用于工业化生产还需要进行深入的探索。

第四节 酶工程与功能性食品配料

一、低聚糖

低聚糖又名寡糖 (oligosaccharide), 是指由 2~10 个单糖通过糖苷键连接形成的直链或支链

的低度聚合糖,分功能性低聚糖和普通低聚糖两大类。蔗糖、乳糖、麦芽糖、麦芽三糖和麦芽四糖等属于普通低聚糖;低聚果糖、低聚半乳糖、木低聚糖、异麦芽低聚糖、麦芽低聚糖、大豆低聚糖、低聚异麦芽酮糖和低聚龙胆糖等则属于功能性低聚糖。低聚糖具有重要的功能特性,主要有:①很难或不被人体消化,产热低;②活化肠道内双歧杆菌并促进其生长繁殖;③不被口腔内微生物利用,不会引起龋齿;④属于水溶性膳食纤维,具有食用纤维的部分功能。作为功能食品的基料,低聚糖广泛应用于各类保健食品和补品中。其中最具影响的是异麦芽低聚糖和麦芽低聚糖,年产量已超过万吨。目前利用酶法制取功能性低聚糖已成为工业化大规模生产低聚糖的主要方法。

(一) 异麦芽低聚糖

异麦芽低聚糖又称分支低聚糖(branching oligosaccharide),是指葡萄糖之间至少有一个以 α -1,6-糖苷键结合而成的单糖数在2~5不等的一类低聚糖。它是功能性低聚糖中产量最大、应用最广泛的一种新型生物糖源,通常以优质淀粉为原料,采用多种酶联合作用制成。异麦芽低聚糖能够提高免疫力和抗病力,是公认的双歧杆菌的生长促进因子。它甜味柔和,黏度低,保湿性好,水分活度低,在酸性条件下对热稳定性好,是儿童糖果、饮料等食品的理想原料。目前在国内外已经广泛地应用于保健品工业和其他食品工业。

生产异麦芽低聚糖的关键酶为 α -葡萄糖苷酶(α -glucoasidase),又称葡萄糖基转移酶,它能切开麦芽糖和低聚麦芽糖分子中的 α -1,4-糖苷键,并将游离出的一个葡萄糖残基转移到另一个葡萄糖分子或麦芽糖和麦芽三糖的分子的 α -1,6位上形成异麦芽糖、异麦芽三糖、异麦芽四糖和潘糖等分支低聚糖。微生物中细菌、酵母、霉菌等菌株均能够分泌 α -葡萄糖苷酶,其中黑曲霉产酶较高。

中科院微生物所、江苏省微生物所和无锡轻工业大学等单位从1990年代开始即着手 α -葡萄糖苷酶生产菌种的筛选和异麦芽低聚糖的研制研究。1997年无锡轻工业大学与无锡第三制药厂合作生产的异麦芽低聚糖所含异麦芽糖和潘糖等分支糖占总糖的53%~55%,与日本IMO-500型产品相同。

张齐军等以木薯淀粉为原料研究了酶法生产异麦芽低聚糖工艺。首先采用 α -淀粉酶对木薯淀粉液化,酶灭活后再加入真菌 α -淀粉酶和 β -淀粉酶糖化得麦芽糖浆,然后通过 α -葡萄糖苷酶的转苷作用得到异麦芽低聚糖。这种方法缩短了总的糖化转苷时间,因此有利于生成更多的分支低聚糖。

日本林原生化研究所的研究是以玉米淀粉为原料,经过液化,再利用 α -葡萄糖苷酶和 β -淀粉酶两种酶糖化制成含异麦芽糖的混合糖,称为“异麦芽低聚糖浆”。金其荣等同样以玉米淀粉为原料,采用相同的生产工艺,得到含22%异麦芽糖和21%潘糖等其他分支低聚糖的异麦芽低聚糖浆。杨连生等研究了以 α -葡萄糖苷酶为主酶制备异麦芽低聚糖,在加酶量200IU/g麦芽糖,麦芽糖浓度20%,pH 5.5,温度60℃的适宜条件下,反应25h,可以制得含25.2%异麦芽糖和24.0%潘糖的异麦芽低聚糖,其异麦芽糖含量等主要指标优于日本同类产品。

周中凯、王洪岩研究了酶法生产异麦芽低聚糖的新工艺,首先通过130~140kPa压力的热蒸汽处理淀粉浆,在95℃下加酶维持30~60min,然后采用多酶协同作用的糖化工艺,在58℃和pH 5.6的条件下反应40h,最终产品中异麦芽低聚糖的含量可达57.6%。

(二) 壳低聚糖

壳低聚糖一般是指由甲壳质或壳聚糖制得的 2~8 糖的低聚糖。为了加以区别,可将由甲壳质制得的低聚糖称为甲壳质低聚糖;由壳聚糖制得的低聚糖称为壳低聚糖。甲壳质低聚糖具有非常爽口的甜味,随着聚合度的增大其甜味、吸湿性和溶解度降低,具有调节食品水分和改善食品结构等功能。

最近研究发现甲壳质或壳聚糖的低聚糖具有抗肿瘤的生理功能,并且对植物体的防御功能起到重要作用。有学者指出,壳低聚糖可以促进蛋白质的合成,促进植物细胞的活化,从而刺激植物快速生长。目前已有很多有关酶法制备壳低聚糖的报道。日本学者岛原直接利用能生产甲壳质酶的微生物开发了简便的酶解法,即在含有胶体状甲壳质的液体培养基中培养出从海水中分离出来的鳃弧菌 E-383,可获得较高收率和选择性的 N-乙酰基壳二糖。大宝使用芽孢杆菌属 SP7-M 株得到的壳聚糖降解酶,成功地获得了由 2~5 糖的壳低聚糖。板井利用芽孢杆菌属 R-4 生产的脱乙酰基壳聚糖酶获得了 1~4 糖的低聚糖。现已发现许多脱乙酰基壳聚糖酶,一般可生成 2~6 糖的壳低聚糖。

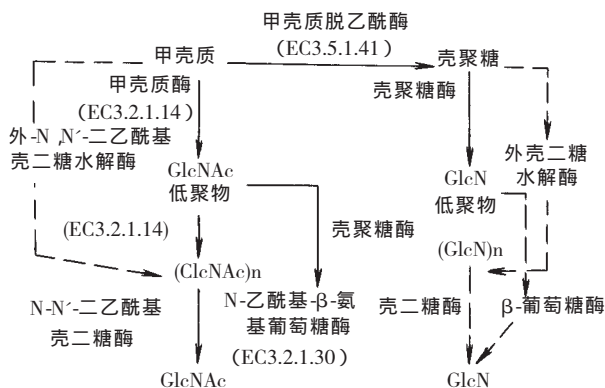


图 4-17 甲壳质、壳聚糖的酶降解

甲壳质或壳聚糖降解酶广泛分布于细菌、放线菌、霉菌等微生物中,该酶在甲壳质或壳聚糖的低聚糖制备中的作用见图 4-17。

(三) 蔗果低聚糖

蔗果低聚糖 (fructo-oligosaccharides, FOS) 又名低聚果糖或寡果糖,通常指利用 β -果糖基转移酶在蔗糖的果糖残基 C¹ 和 C² 位置上,通过 β -1, 2-糖苷键与 1~3 个果糖分子结合形成蔗果三糖 (GF₂)、蔗果四糖 (GF₃) 和蔗果五糖 (GF₄),属于果糖和葡萄糖构成的直链杂低聚糖。蔗果低聚糖是肠道内双歧杆菌的活化增殖因子,具有低聚糖的一般功能。该糖最先由日本明治制果公司研究开发,并于 1984 年以产品形式投放市场,销售前景良好。

工业上蔗果低聚糖有下述两种生产方法。

①以菊芋 (chicory) 为原料提取菊粉,经酶水解而成。该法具有工艺简单、转化率高和副产物少等优点,生产的关键在于菊粉酶的提取。菊粉酶 (inulinase) 为 β -2, 1-D 呋喃果糖水解酶,许多微生物如酵母、黑曲霉及少数几种细菌枯草芽孢杆菌均能合成此酶。据文献报道,菊粉用内切型菊粉酶水解可得到聚合度为 2~8 的蔗果低聚糖,菊粉若用外切型菊粉酶水解则得到果糖。比利时 ORAFIT 公司曾大规模种植菊芋,开发生产蔗果低聚糖。

②由蔗糖经 β -果糖基转移酶 (β -fructosyltransferase) 或 β -呋喃果糖苷酶通过转果糖基反应生成蔗果低聚糖类。Fischer 等人认为酶的催化作用分两步进行,第一步形成酶-果糖复合物释放出葡萄糖,第二步该复合物将果糖基转移给水或蔗糖生成果糖或三糖。工业上用黑曲霉生产 β -果糖转移酶,此酶在低浓度蔗糖溶液中催化蔗糖水解为葡萄糖和果糖,但在高浓度蔗糖溶液中却发生

转移反应合成蔗果低聚糖。蔗果低聚糖在制取反应中常用的蔗糖底物浓度为 0.625kg/L 。微生物培养液可以不经分离精制,就直接作为酶源添加到蔗糖溶液中,酶的添加量通常为每克蔗糖 2.5 个酶活单位,反应温度一般为 $30\sim 40^{\circ}\text{C}$,最适 $\text{pH } 5.0\sim 6.0$ 。

菌种筛选及酶的制取是生产低聚糖的关键,常用的菌种为黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、日本曲霉 (*Aspergillus japonicus*) 和出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*) 等。韩国学者 Yun J. W. 和 Jung K. H. 等研究证实了由出芽短梗霉产生的 β -果糖基转移酶具有生产蔗果低聚糖的能力。日本学者 Muramatsu M. 等采用聚多曲霉 (*Aspergillus sydowii*),以蔗糖溶液为底物,生产出一种名为分枝蔗果低聚糖 (branched fructo-oligosaccharides) 的新型蔗果低聚糖。

固定化细胞技术已经在蔗果低聚糖生产中得到成功的应用,由于 β -呋喃果糖苷酶和 β -果糖基转移酶都是胞内酶,因此可以直接固定细胞或菌丝体。魏远安等以壳聚糖为载体,对蔗果低聚糖固定化酶的制备进行了研究,与液体酶相比,固定化酶具有良好的活性和操作稳定性,因此生成物中蔗果低聚糖含量相对较高,蔗糖转化率达 90% 以上,蔗果低聚糖含量达 60% 左右。经固定化酶反应后的产品糖浆色泽透明,口感圆润清香。

(四) 木低聚糖

木低聚糖 (xylooligosaccharide) 是指由 2~7 个木糖以 β -1, 4-糖苷键结合而成的直链低聚糖。木低聚糖一般以富含木聚糖 (xylan) 的植物材料 (如玉米芯、蔗渣、棉子壳、麸皮等) 为原料,通过木聚糖酶的水解作用分离精制而获得。木低聚糖产品的主要成分为木糖、木二糖、木三糖和三糖以上的木聚糖,其中木二糖为主要有效成分。木低聚糖在人体内难以消化,具有极好的促进双歧杆菌增殖活性。

木低聚糖的生产工艺包括木聚糖的提取、精制、水解和木低聚糖的纯化等过程。酶法制备木低聚糖时,由木聚糖酶从主链内部作用于长链木聚糖的糖苷键,能将木聚糖随机地切成不同链长的木低聚糖,而 β -1, 4-木糖苷酶能够作用于木低聚糖的末端产生木糖。

自然界中很多霉菌和细菌能产生木聚糖酶 (xylanase),工业上多采用球毛壳霉 (*Chaetomium globosum*) 产生内切型木聚糖酶进行木聚糖的水解。许多丝状真菌都产木聚糖酶及 β -1, 4-木糖苷酶。 β -1, 4-木聚糖酶不能水解木二糖,而 β -1, 4-木糖苷酶则可将木二糖水解为木糖。因此筛选产内切型木聚糖酶 (endo-1, 4- β -D-xylosidase, EC3.2.1.8) 活力高,而外切型 β -1, 4-木糖苷酶 (exo-1, 4- β -D-xylosidase, EC3.1.37) 活力低的菌株是生产木低聚糖的关键。

尽管木聚糖酶是一种复合酶,但其中所含的各种酶组分在不同浓度溶液中的溶解度不同,所以利用酶的这一特性可以将内切木聚糖酶和 β -1, 4-木糖苷酶分开,达到去除 β -1, 4-木糖苷酶的目的。洪枫等通过探索找到一种沉淀剂 H,它可将内切-型聚糖酶沉淀下来,而将大部分的 β -1, 4-木糖苷酶保留在母液中,从而起到有效地分离作用。

二、果葡糖浆

(一) 果葡糖浆的功能和应用

果葡糖浆是 20 世纪 60 年代以后出现的,它是以淀粉为原料,通过 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶

水解形成葡萄糖，再利用葡萄糖异构酶的异构化反应，制成一种含有果糖与葡萄糖的混合糖浆。第一代果葡糖浆含 42% 的果糖；第二代果葡糖浆也称为高果糖浆，含果糖 55%，甜度约为蔗糖的 1.1 倍；第三代果葡糖浆被称为高纯度果葡糖浆，果糖含量为 90%，甜度为蔗糖的 1.4 倍。

果葡糖浆溶解度高，发酵性能好，化学稳定性高，并且易为人体所吸收，因此在饮料工业广泛应用，在面包、糕点、罐头和冷饮等领域也有不同程度的应用。由于果葡糖浆本身具有较高的营养保健价值，因此被用来加工营养食品和疗效食品。

在发达国家，果葡糖浆已发展到第三代，并且渗入到食品工业的各个领域。我国也于 1960 年开始对果葡糖浆进行研究，1980 至 1990 年，我国先后从美国、比利时和丹麦等国引进果葡糖浆生产线，目前产品仍以第一代为主，明显落后于发达国家。这主要是因为国产果葡糖浆的价格一般高于蔗糖，而且生产工艺复杂，产品质量也不够稳定。

(二) 果葡糖浆的酶法合成

欧洲一些国家和美国在生产和应用果葡糖浆方面都走在世界前列，这些国家主产玉米，稻谷相对较少，以玉米为原料生产果葡糖浆的工艺和设备已经发展到很高的水平。在我国引进的十几条果葡糖浆生产线中，基本上都是采用玉米为原料生产的。与薯类相比，玉米淀粉含量高，易于运输和贮藏，而且生产不受季节限制，所以玉米已成为我国制造淀粉的主要原料，玉米淀粉也已占我国淀粉总产量的 90% 左右。

据报道，国外对其他原料如木薯、大米、马铃薯、小麦等进行过研究，最终其自产且价格低廉的玉米为原料。在我国一些盛产大米的地方也开始尝试以大米为原料生产果葡糖浆，以充分利用本地资源优势。

1960 年美国和日本开始研究采用葡萄糖异构酶将葡萄糖转化成果糖，当时葡萄糖异构酶是由放线菌产生的。目前具有工业生产价值的菌种很多，如凝结芽孢杆菌、米苏里游动放线菌、树枝状黄杆菌等。

果葡糖浆的生产工艺主要包括淀粉的液化、糖化和异构化等步骤。首先，淀粉乳在 α -淀粉酶的作用下被液化成 DE 值为 15%~20% 的液化液，液化液经调整 pH 和温度，并加入糖化酶进行糖化至糖化液 DE 值达到 96%~98%，然后过滤，最后再用活性炭和离子交换树脂处理，成为净化的葡萄糖液。被净化后葡萄糖液通过装有固定化异构酶的反应器被异构化，最终得到果糖含量在 42% 左右的果葡糖浆。周中凯等研究了酶促水解蔗糖生产果葡糖浆新工艺，他们以黑曲霉 (*Asp. niger*-W₁) 为出发菌，通过紫外诱变和亚硝基胍处理获得蔗糖酶高产菌 (*Asp. niger*-W₃)，再经过固态发酵培养获得高活力蔗糖酶。该酶在 50~55℃ 有较高活力，在 pH 5.5~6.0 范围内有较高稳定性。

用游离酶生产果葡糖浆存在很多缺点，20 世纪 70 年代初期又研究发展了固定化葡萄糖异构酶，而且很快商品化。采用固定化葡萄糖异构酶已经实现果葡糖浆的连续化生产，并且生产效率显著提高，产品质量明显改善，从而推动了果葡糖浆工业的发展。

三、水解动植物蛋白

过去一直认为蛋白质必须通过人体消化道中的多种蛋白酶水解后，最终以氨基酸的形态被消

化吸收。但是最近的研究表明，蛋白质在肠道的最主要的吸收方式不是游离氨基酸而是小肽类，因此蛋白质的分解产物作为高效氮源受到国际营养界和食品产业的高度重视。乳蛋白、大豆蛋白、畜血蛋白和玉米蛋白的水解产物已经成为运动饮料、功能食品和医疗食品的重要原料。

(一) 水解植物蛋白

水解植物蛋白(HVP)是指在酸、碱或酶作用下，水解含蛋白质的植物组织所得到的产物。这些产物通常分子量小、水溶性较高、无蛋白质变性及在人体内容易消化吸收，不但具有可适用的营养保健成分，而且可用作食品调味料和风味增强剂。植物蛋白水解物的生产一般采用蛋白质含量为50%~80%的植物组织，一般采用脱脂大豆粕、玉米、麦类、稻米等，目前研究最多的是水解大豆蛋白。

1. 水解大豆蛋白的功能特性及应用 大豆蛋白资源丰富，价格低廉，并且具有丰富的营养价值，但是大豆蛋白分子结构复杂，80%的蛋白质分子量在10万以上，因此存在溶解性低、消化率和生物效价也不如蛋和奶等动物性蛋白的问题。大豆蛋白经蛋白酶水解、分离和精制后可得到以分子量低于1000的低聚肽为主的混合物，即大豆多肽。大豆多肽的氨基酸组成与大豆蛋白质相同，必需氨基酸平衡且含量丰富，同时无蛋白变性，无豆腥味。此外大豆多肽还具有比大豆蛋白更丰富的加工特性、营养特性和生理功能，其主要功能特性如下。

(1) 具有水溶性和流动性。具有良好的水溶性和较低的黏性，流动性良好。

(2) 具有酸溶性。在大豆蛋白的等电点pH 4.3附近保持溶解状态，这为开发酸性饮料提供了条件。

(3) 具有抑制蛋白质形成凝胶的性质。利用这种性质可以调整蛋白质食品的硬度并且改良口感。

(4) 具有促进乳酸菌、双歧杆菌、酵母和霉菌等多种微生物生长发育和活跃代谢的作用。用于酸奶、干酪、醋、酱油和发酵火腿等发酵食品生产时，可明显起到提高生产效率、稳定品质及增强风味等效果。

(5) 具有易消化吸收、能迅速给机体提供能量、促进脂质代谢和恢复体力等功能。因此可用于特殊病人、消化功能衰退的老年人以及消化功能未成熟的婴幼儿的营养剂和流态食品；还可用于制造运动员食品、蛋白质强化食品和能量补给饮品等。

(6) 具有低抗原性。其抗原性通常比大豆蛋白降低1%~2%，因此食后不会引起过敏反应。因此可用于制造婴幼儿奶粉和甜点心等非致敏性保健食品。

(7) 具有降低和抑制胆固醇的作用。利用这一特性可生产降胆固醇、降血压、预防心血管系统疾病等功能保健食品。

2. 水解大豆蛋白的酶法制备 水解大豆蛋白制备的方法主要有酶法和化学法，由于酶法水解效率高，反应条件温和，产生毒性物质的可能性较小，因此受到国内外研究者的广泛关注。目前应用于实际生产的酶有胰蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶等，其中碱性蛋白酶作用效果较好。

李书国等研究的大豆多肽的加工工艺流程为：

脱脂大豆粕→浸泡→磨浆分离→胶体磨→精滤→超滤→预处理→酶水解→分离→脱苦、脱色→脱盐→杀菌→浓缩→干燥。

该工艺采用脱脂大豆粕为原料制取大豆分离蛋白溶液。因为大豆球蛋白分子结构紧密，不利于酶的水解，所以在酶解大豆蛋白时需要进行预处理，使其中的蛋白质复杂结构被打开而形成一条直链，从而加快蛋白质的酶解。实验采用 AS₁₃₈₉ 中性蛋白酶进行酶水解，酶的用量为 4%，水解温度 45℃，作用时间 12h，底物浓度 4%。

张玲华等采用菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶和双酶法降解大豆蛋白，研究结果表明，双酶法水解大豆蛋白的水解度最高，而且水解产物的苦味明显弱于单酶水解法。邓勇等研究了 Acalase 碱性蛋白酶、AS₁₃₉₈ 碱性蛋白酶、Neutrased 中性蛋白酶、Protamax 复合蛋白酶、HAP 低温高碱碱性蛋白酶等 5 种蛋白酶对大豆分离蛋白的水解效果，筛选出作用效果最好的为 Acalase 碱性蛋白酶。其最佳工艺条件为：温度 55℃，pH8.0，底物浓度 2%，酶用量 5%，水解时间为 4~6h。

大豆蛋白经过酶水解形成小分子产物，营养价值提高，并且具备了一定的功能特性。但其中也产生了一些带有苦味的游离氨基酸及其衍生物和小分子肽物质，直接影响了水解产物的风味及其在食品加工中的应用。有关大豆多肽苦味产生的原因及其脱苦的方法将在本章第七节新型酶制剂中论述。

(二) 水解动物蛋白

水解动物蛋白是指蛋白酶作为生产生物催化剂，把肉类、水产品及乳品中的蛋白质分解成含有多种氨基酸和肽类的水解液。水解动物蛋白产品含有多种氨基酸、肽类和核苷酸类物质。因此营养丰富，易于消化吸收。游离的氨基酸和核苷酸类都具有极好的呈味能力，味道鲜美，香气自然，稳定性较高，可作为调味剂或营养强化剂应用于多种食品的加工。

与水解植物蛋白相同，水解动物蛋白质经过酶水解以后，它的某些功能特性和风味特征会发生一定程度的改变，通常是溶解性增加，热稳定性提高，受热不凝聚，黏度、乳化性能、渗透性减小。

1. 水解鱼蛋白 鱼类蛋白质品质优良，其氨基酸比例与人体肌肉成分极为接近，人体吸收利用率较高。鱼类蛋白质经过水解，其营养品质和功能特性将进一步得以改善，因此对鱼类蛋白水解物进行开发已经引起人们的关注。特别是当今鱼类资源的日益匮乏，对低值鱼和鱼类加工副产物的加工利用更具有重要的意义。

狭鳕 (*Theragra chalcogramma*) 广泛分部于北太平洋，鱼肉蛋白质含量达 15%~19%，所含氨基酸齐全，具有很高的开发利用价值。鳕鱼目前多用于制作鱼片和鱼糜等制品，在其加工过程中会产生大量废弃物——鳕鱼碎肉和鳕鱼排等。王长云等利用枯草杆菌 AS₁₃₉₈ 中性蛋白酶水解鳕鱼碎肉提取水解蛋白，用黄曲霉对鱼蛋白水解液进一步水解，有效地脱去了苦味。水解液经真空浓缩及喷雾干燥得到水解蛋白粉，该制品可以作为蛋白强化剂应用于各类食品中。

赵玉红以鲢鱼下脚料中的蛋白质为原料，研究了酶水解鱼蛋白的功能特性，主要包括：①具有很好的溶解性，在 pH 2.0~10.0 的范围内溶解性均大于 94%；②具有优良的热稳定性和冷藏稳定性；③黏性变小，起泡性为初始体积的 3.40~4.30 倍，但泡沫稳定性在酸性条件下变差。

熊光汉比较了胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶对鲢鱼蛋白的水解效果，证明了胰蛋白酶水解效果最好，水解产物蛋白质含量达到 85% 以上。杉山圭吉以沙丁鱼蛋白质为原料，比较了 3 种碱性蛋白酶、2 种中性蛋白酶和 3 种酸性蛋白酶的水解作用效果，证明碱性蛋白酶水解效果好，所得产物溶解性好，营养价值高。Hoyle 通过对鲱鱼蛋白水解的研究表明，碱性蛋白酶的水

解能力比中性蛋白酶强，水解产物的苦味相对较小。

2. 水解乳蛋白 乳蛋白是一种重要的蛋白质资源，在食品加工中具有重要的作用。但是在酸性条件下，乳蛋白不稳定，易于沉淀，这使其应用受到一定限制。乳蛋白水解物具有优良的营养特性和加工特性，因此能够更加广泛地应用于各类食品加工。酪蛋白(casein)是牛乳中主要的蛋白质，其中富含生物活性序列，在特定条件下对其进行酶水解时，可使其被释放出来，从而获得具有生物活性的酪蛋白生物活性肽，如降血压肽、免疫调节活性肽、酪蛋白磷酸肽、抗菌肽以及类吗啡肽等。牛乳酪蛋白中含有的多种特定生物活性肽的序列是否能够从酪蛋白中释放出来，关键在于所使用的酶、水解条件及水解时间，水解的程度控制在恰当的范围时，才能够得到理想的活性肽。

第五节 酶工程与食品原料的改良

因为酶能在常温常压下催化各种生物化学反应，近几十年来，酶的应用已逐渐成为食品工业和化学工业等行业生产的重要手段，人们对微生物酶应用的有效性已得到广泛的认同，酶工程对食品原料的改良也正发挥着日益重要的作用。

一、小麦面粉品质的改良

(一) 面包烘烤用粉的改良

在现代社会里，面包制造过程加快，品种增加，自动化程度提高，酶工程就起着越来越大的作用。欧美各国常对面粉添加酶进行强化，用酶活力高的面粉制成的面包，其气孔细小而分布均匀，体积大，弹性好，色泽佳。小麦面粉中含有各种酶，面包是利用面粉中的酶和酵母菌的作用制成的食品。但是普通的面粉往往不一定具有适合于制造面包的性质，并且消费者对面包质量要求也日趋多样化，仅用面粉自身的酶是不够的。添加适当的淀粉酶和蛋白酶等可以提高面粉的烘烤品质。

1. α -淀粉酶与面粉烘烤品质 面包制造的基本原理是在小麦面粉中添加酵母、水等辅料，揉制均匀成面团后，在 30℃ 左右发酵几小时，酵母作用于小麦粉中的发酵性糖，或由面粉中的淀粉酶生成的发酵性糖反应后生成 CO₂。因此，面团膨胀呈多孔性，放 200℃ 左右烤炉中烘烤后就成熟为面包。

在小麦粉中加入 α -淀粉酶时，因麦芽糖的生成量增加，酵母对其发酵后，二氧化碳的产生量增加得相当多，从而增加面包的体积。添加淀粉酶后，面团就变得柔软，因而增加了面团的伸展性和保持气体的能力，容积增大，出炉后能制成触感良好的面包。在烘烤工序中，面团一放入烤炉，随着温度的上升，急速发酵，气体量增加，热的气体就膨胀，因为挥发成分的气化和气体的产生而使体积增大。温度上升至一定程度时，蛋白质就凝固，使膨胀后的形状固定，从而形成面包的骨架。如果 α -淀粉酶少，淀粉凝胶的黏度就过高，就没有容纳气体的能力，制成的面包外形塌陷。因此，较优良的面包制造必须补充适量的 α -淀粉酶。

不同来源的淀粉酶，其耐热温度不同，曲霉 α -淀粉酶的失活温度低于细菌 α -淀粉酶，在烘烤

用粉中,曲霉 α -淀粉酶勿需控制用量,因为它在烘烤的初期即失活了。而细菌 α -淀粉酶在烘烤的中期仍有残留活性,所以应严格控制用量(一般在0.01%左右)。

2. 蛋白酶与烘烤品质改良 小麦粉中的蛋白质对面团的形成有着重要的影响,但蛋白质的数量并不是决定小麦粉烘烤质量的惟一因素,有些硬粒小麦的蛋白质含量虽然高,而其烘烤质量却较差。由于蛋白酶作用于小麦粉的蛋白质,使它变成肽、氨基酸以供给酵母氮源,促进发酵。这是因为在发酵初期,酵母可利用存在于小麦粉中的含氮化合物,但在后期就明显不够了,添加蛋白酶的效果就显示出来了。

蛋白酶作用于面筋蛋白质的肽键,将它分解为小分子量物质,使面筋软化,增加延伸性,使面团的黏弹性适中,缩短混揉时间,节约动力。在小麦粉中添加0.25%曲霉蛋白酶时,混揉时间可缩短20%。由于降低了弹性使面团的伸展性增加,面筋的膜变薄,发酵时面筋的网孔变得细密,可得到触感柔软,紧密而细孔均匀的面包。

蛋白酶在面团发酵时所生成的氨基酸,在烘烤中会与糖发生羰氨反应(美拉德反应),可使面包外皮色泽更好,增加面包香味。但需控制适量,否则颜色有恶化的可能性。

不同来源的蛋白酶,对烘烤性质有所差异。同一种菌,当菌株不同时,影响也有可能不同。在改良小麦焙烤用粉时,选用专一性较狭窄的蛋白酶较好。面筋蛋白的肽键没有必要分解至小到氨基酸和小分子肽的程度,在一根肽链中只切断1~2处就已足够了。因为面团和面包仍需面筋的网络构架,如果水解切断太多,面包的基本骨架会受影响。

改良小麦烘烤用粉所使用的蛋白酶,应该选用热稳定性低的酶,因为需要它在面团形成初期起作用,在烘烤过程中又希望它失去作用。例如添加失活温度在55~60℃的蛋白酶,在烘烤初期就会自然失活。

3. 乳糖酶与面包品质改良 生产奶味面包时,在小麦粉中加入其重量10%的奶粉,再加入不超过0.06%重量比例的霉菌乳糖酶,按正常的生产工序操作后,观察面包烘烤时气体的生成量,可以看到应用乳糖酶的效果明显好。

面包配方中添加脱脂奶粉及乳糖后,会感到甜度不够,酵母也不能发酵,但经乳糖酶分解后,生成的葡萄糖可以使酵母充分发挥,产生气体使面团膨大。另外,半乳糖也可通过羰氨反应提高面包的色泽。

4. 脂肪酶与面包品质改良 不饱和脂肪酸氧化还原酶可改善面包的风味和色泽等。当生产白面包时,效果明显。不饱和脂肪酸氧化还原酶大多含于大豆胚芽中,故加入小麦粉重量的0.5%~1.0%的大豆粉和脱脂大豆粉时,其中的不饱和脂肪酸氧化还原酶可漂白小麦粉中的类胡萝卜素及亚油酸。由亚油酸生成的过氧化物,可改善面包的香气,因为脂肪酶可使乳脂中微量的醇酸或酮酸的甘油酯分解,从而生成 δ -内酯等香味物质。

在面包用粉中添加植物种子来源的精制的脂肪酶还能防止面包老化。因为脂肪酶作用,将12碳以上的长链甘油三酯分解为甘油二酯或单甘酯的缘故。

(二) 饼干用粉品质改良

在饼干用粉中加入适量的蛋白酶可以矫正小麦粉中的面筋含量,能更好地发挥面团的机械适应性及伸张性,使它减少在烤炉中的收缩,改善烘烤弹性,并能缩短发酵时间,但不改变饼干的风味。

(三) 面条用粉的改良

加工制作“挂面”时,除小麦粉本身酶的自然作用外,如果再使用蛋白酶,小麦粉中的面筋就变为肽、氨基酸,制品的风味就可以提高,另一方面,随着面筋性质的改良,口味也属上等。

用蛋白酶强化的面粉制作通心面条,延伸性好,风味佳。含有蛋白酶的面粉,使麸质部分水解,面条硬直,风味也好,制面工艺中应用蛋白酶仍有较好的前途和效益。

(四) 糕点馅心的改良

糕点馅心中的填料和基料常用淀粉,添加 α -淀粉酶可以改善馅心的风味和质地。糕点制作中添加转化酶后,可以使蔗糖水解为转化糖,从而防止糖浆析晶。

二、水果类加工品质的改良

水果中均含有少量的果胶物质,增大了黏性,果胶在酸性和高浓度的糖存在下,可以形成凝胶,在制造果酱、果冻以及混浊型果汁时,要利用果胶的特性,但生产澄清型果汁时,它却使压榨和澄清发生困难。

(一) 果胶酶、纤维素酶等与果汁的澄清和出汁率提高

在澄清果汁的生产中,需要加入果胶酶等酶制剂。水果中所含的果胶质,使溶液黏度增大,使果汁过滤困难,而且即使过滤之后,在果汁中所存在的微量果胶和其他高分子物质在贮藏中因分解、与金属离子结合及其他作用,也会产生凝固沉淀。因此有必要分解果胶质,使过滤容易,过滤时间缩短,以得到透明的果汁。同时果胶酶的加入,促使组织细胞释放出果汁,使果汁的出汁率增高。一般在溃碎的果实中加入果胶酶处理,即可达到目的和要求。

果汁中的酸度基本不用调整就能使果胶酶发挥作用,果汁中的防腐剂或漂白剂 500mg/L (以 SO_2 计)以下浓度,也不影响酶的澄清作用。果胶酶的作用时间通常为 $1\sim 12\text{h}$,果胶酶与半纤维素酶共用时,澄清更迅速,而且不影响天然果汁的风味与色泽,可以得到优质澄清的果汁。纤维素酶对纤维素类物质的降解可促进果汁的提取与澄清,提高可溶性固形物含量,并可将果皮渣综合利用。目前已成功地将柑橘皮渣酶解,制取全果饮料,其中的粗纤维经纤维素酶的酶解后,50%转化为可溶性糖;另50%降解为短链低聚糖,它构成全果饮料中的膳食纤维,具有一定的保健价值。果胶酶与半纤维素酶共用时,澄清更迅速,而且不影响天然果汁的风味与色泽,可以得到优质澄清的果汁。

(二) 低糖果冻

果冻的生产是果汁经浓缩成高浓度果汁后,在高浓度糖存在下凝结而成的。形成果冻所需的糖量较高,太浓的甜味使果冻失去了果实的真实感,更不符合当今食品低糖化的保健要求。采用纯化的果胶酶(PE)处理果汁,使果胶的甲基化程度降低。这种甲基化程度低的果胶在 Ca^{2+} 作用下,即使糖度较低,也能形成稳定的果冻。

(三) 果胶酶与水果罐头加工

橘子罐头中,橘子囊衣传统上是用盐酸和氢氧化钠去除的,耗水量大,费工时。整个去囊膜过程中橘瓣的破碎率高达15%左右,果糖流失达20%,因为盐酸的处理,脱囊的果内中还存在着氯根问题。特别是盐酸、氢氧化钠脱膜废液易产生废水污染。而用果胶酶来脱囊膜,能解决其中

许多问题。果胶酶 0.2% 浓度, pH 3.5, 40℃, 用橘片重量 1.5 倍的酶液处理 90min, 剩余酶液可反复使用至残留酶活下降至 50%, 可以采用高温或 0.2% 碱浸 10min 使酶灭活。应注意使酶彻底灭活, 因为如果有残留酶活, 容易造成果肉在贮藏中的软化。现在一般采用黑曲霉所产生的果胶酶、半纤维素酶和纤维素酶的混合物, 可圆满地除去橘瓣囊衣, 从而避免上述缺点。另外, 莲子肉皮、大蒜膜层和杏仁等果实的皮膜, 也可用果胶酶脱除。

(四) 脱苦酶与水果的脱苦

1. 果汁和果汁罐头的脱苦 未成熟的橘子、酸橙、葡萄等水果中, 因含有柚皮苷较多, 当其含量超过 50mg/100mL 时即有苦味, 就妨碍了这些果汁的广泛利用。脱苦酶或柚皮苷酶由 β -鼠李糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶组成, 它能将柚皮苷分子中的鼠李糖和葡萄糖水解掉而除去, 最终成为无苦味的柚皮素。利用脱苦酶处理该类果汁, 一般经 30~40℃, 作用 1h, 便能脱苦。当柚皮的含量 \leq 40mg/100mL 时, 就感觉不到苦味了。对柚皮含量极高的果汁, 在各种条件下使用时, 应注意酶使用量与作用时间的关系, 对于苦味大的纯果汁, 酶用量为 0.2% 或 0.4%, 在 45℃ 下, 作用 1~20h, 对浓缩果汁的脱苦处理, 以尽可能不稀释就进行酶处理较好。

脱苦酶可以用曲霉、青霉等菌株生产, 市售的脱苦酶是由黑曲霉所制得。柚皮因为加热可促进溶化, 所以在冷冻果汁脱苦时, 为了更有效地进行脱苦, 最好在酶作用前用 60~70℃ 加热 8~10min。

在 pH 很低 (pH < 2.5) 的果汁中, 脱苦效果会降低, 所以最好在果汁中添加柠檬酸钠等, 把果汁 pH 提高到 2.8~3.8 为宜。

从残次果、落果、受冻害的水果所得果汁或二次、多次榨汁后的苦味较强的低级果汁, 使用脱苦酶处理后, 可制造富有风味的优质粉末果汁, 可以将食用价值很低的原料加以回收利用。

在制造酸橙、葡萄、甜酸橙等含有柚皮苷的水果罐头时, 装罐后, 在注入的糖液中添加 0.003% 左右重量比的脱苦酶, 然后再填充封罐, 杀菌冷却。产品在制造后 2~3 周内苦味会显著地脱去。

2. 橘皮酱原料的脱苦 橘皮酱原料一般是酸橙、甜橙、柚子、橙子、橘子等柑橘类果皮, 这些原料中由于柚皮苷的苦味非常强烈, 所以需要脱苦酶脱去苦味。随着脱苦酶的开发和生产, 有苦味类果皮的应用问题解决了, 可以充分利用该类资源。

果皮等废弃物的处理, 一般是经过干燥除去水分, 这样用酶处理的费用就低些。

(五) 橙皮苷酶与防止橘子罐头的白浊

橘子果肉中所含难溶性的橙皮苷, 在橘子罐头的糖汁中会析出结晶, 使糖汁生成白色沉淀, 造成白色混浊, 或者在果肉上附着白斑等, 从而降低了产品质量。为了防止这些现象发生, 用橙皮苷酶分解橙皮苷, 使其水解成为水溶性的橙皮素, 可解决这些问题, 同时能使其保质期延长至 9 个月。

在制罐工艺中的注汁工序, 可注入含一定量橙皮苷酶的糖汁, 可有效保证橘子罐头的质量。橙皮苷酶在低 pH 时易失活, 所以使用橙皮苷酶时注意调整糖汁的 pH。

以往用含甲基纤维素的糖汁也能抑制橙皮苷结晶的生成, 可以防止白浊, 但不能根本解决问题。因为橘子罐头的白浊在整个制造期间都有产生, 不只是单纯地由橙皮苷的原始含量而引起, 也受到果肉中促进橙皮苷可溶出的物质的影响, 加入橙皮苷酶后, 它在罐头的加热杀菌后仍残存

酶活,可以从果肉中溶出来,渗透到糖汁中的橙皮苷,会逐渐被分解为橙皮素,不会造成糖汁的混浊。所以,使用橙皮苷酶制造橘子罐头,可以使其在保质期内品质有保证。橙皮苷酶可以由黑曲霉为来源而生产。

(六) 花青素酶与有色水果果汁的脱色

花青素苷使葡萄、杨梅、桃子、苹果、紫苏等水果具有色泽,这些色素与马口铁的锡结合变为紫色或红色等降低食用价值,花青素苷随 pH 不同而变色,在光照和高温下也很快褐变,这些特性均不利于产品色泽的稳定。

花青素酶是 β -葡萄糖苷酶的一种,能将花青素苷分解成为葡萄糖和花青素,因为花青素不稳定,分解为无色体,失去了花青素苷类特有的颜色。

这类果汁,通常很容易发生酶促褐变,所以要对榨汁进行充分的灭酶处理后,再进行果汁的脱色处理,以防酶促褐变的突然发生。

脱色处理时,与聚磷酸盐等螯合剂并用时,具有增强脱色效果的倾向。在酶作用时,不必调整 pH,加入一定浓度的酶,40℃保温 20~30min 即可脱色,脱色作用完成后,通常采用果汁杀菌的加热条件使酶失活。所以用花青素酶处理桃酱、桃汁、葡萄汁等,可以有效脱色,提高经济价值。

三、牛乳品质的改良

牛乳中约含 4.5% 的乳糖,它是一种缺乏甜味而且溶解度很低的双糖,难以消化,有些人饮牛乳后,发生腹泻、腹痛,其原因就在此。在炼乳、冰激凌中常有砂样结晶析出,影响食品风味,也是该原因。

(一) 乳糖酶与分解乳糖

对不耐乳糖的患者可制造出单独的食用牛乳,在 1mL 牛乳中加入 1~2mg 乳酸酵母 (*Saccharomyces lactis*) 乳糖酶,在 37℃ 保持 30min 即可完全分解其中的乳糖。再经 70℃、15min 杀菌后,对其风味无影响,而且处理乳还有“厚味”的好评。先将固定化乳糖酶装柱,再将灭菌后牛乳以一定速度通过酶柱,使大多数乳糖被水解,水解后的牛乳再经加热处理,使酶变性失活,并杀灭酶解过程中可能污染的有害菌,还可以加入风味物质制成低乳糖咖啡奶、可可奶、果味奶或经喷雾干燥制成低乳糖奶粉。

乳清是干酪生产的副产品,世界年产量达 9 000 多万 t,其中也含有乳糖,因为难以消化,历年作为废水排放,严重污染环境。采用乳糖酶处理,当乳糖水解率达 80% 时,即可供食用或作为饲料,如果进一步用葡萄糖异构酶处理,使其中的葡萄糖转化成果糖,那么甜度会进一步提高。

冷冻乳及浓缩乳中的乳糖结晶会引起乳酪蛋白的凝固。固形物为 35% 的浓缩乳,不加乳糖酶保持在 -10℃ 时,20d 就析出结晶;使用乳糖酶时,放置 150d 不结晶。

在冰激凌混合物中,如果有 12% 以上的脱脂乳固形物时,贮藏及销售中产生乳糖结晶。此结晶在口中呈砂样感,降低了商品价值,如果脱脂固形物为 16%,用酶分解其中 50% 乳糖后,放置四个月仍稳定,而且增加了甜味,冰激凌混合物中的砂糖用量可减少 1%~2%。

(二) 黄油增香

乳制品的特有香味主要是加工时所产生的挥发性物质(如脂肪酸、醇、醛、酮、酯、胺类等)所致。乳品加工时添加适量的脂肪酶可增加干酪和黄油的香味。将增香黄油用于奶糖、糕点等食品,可节约黄油用量,提高风味。脂肪酶分解牛奶的脂质,其挥发性物质也可使牛奶增香。

(三) 溶菌酶与婴儿奶粉

人奶与牛奶的区别之一在于溶菌酶含量的不同。奶粉中添加卵清溶菌酶可以防止婴儿肠道感染。

(四) 脂肪酶与酒类增香

在浸米的水中加入脂肪酶,醪的发酵快,使白米中的甘油三酯分解为游离酸,在蒸煮工序这些游离酸经挥发分散,能制作香气更好的优质酒。

(五) 脂肪酶与类可可脂的制造

由于可可果的原料和生产量的限制,可可脂的产量和价格均不能满足大生产的需要,通过科学家的长期努力,采用酶法改变橄榄油和硬脂酸中甘油三酯的脂肪酸组成,已能制备一种类可可脂。

四、蛋白质功能性质的改良

蛋白质的功能性质是指除去营养性质外能决定食品成分在加工和贮藏中物理性质方面的重要作用,例如起泡性、乳化性、凝胶性等。蛋白质除了能给人们提供营养外,它的功能性质也很重要,它们应用于食品中所表现出来的功能性质还不能充分满足食品加工的要求,所以采用酶制剂将这些蛋白质改性,使能适合于更广泛的应用,已成为开发和利用食品蛋白质新资源研究的重要课题。

蛋白质的酶法改性一般不会导致营养损失,也不会产生毒理问题。据报道,用蛋白酶对经过热处理的棉子进行有控制的水解,不但可以提高棉子蛋白质的提取率,而且改进了其功能性质。在以动物皮骨为原料生产明胶的工艺中,采用碱性蛋白酶代替碱处理,能提高产品质量,缩短生产周期。食品蛋白质的酶法改良研究会进一步深入和发展,从各方面满足食品加工的需要。

五、某些有毒食品原料的改良

人类食用某些植物原料时,其中的有毒成分会对人体产生不利的影晌,采用酶工程技术可以将有毒物质分解而除去。

大豆及豆制品中含有棉子糖(三糖)和水苏糖(四糖)等,它们统称为寡糖。豆类的寡糖中含有 β -半乳糖苷酶和 β -果糖苷酶,而人体中缺乏相应的酶来水解它,当寡糖进入肠道后,能被肠道微生物利用,代谢为 CO_2 、 H_2 以及少量 CH_4 ,这些气体的产生,引起肠胃气胀、呕吐、下泻和肠部难受等。为了消除寡糖对人体的不利影晌,可利用植物中存在的酶,也可将水解 α -1,6-半乳糖苷键的酶加入食品中。

通过酶的作用还可能除去食品中其他的毒素和抗营养素,表4-4总结了这方面可能的应用。

表 4-4 食品中的毒素和抗营养及其脱除

食 品	毒性物及其毒性	脱 毒 酶
乳	乳糖；肠胃不适	β -半乳糖苷酶（乳糖酶）
豆	寡聚半乳糖；肠胃气胀	α -半乳糖苷酶
SCP	核酸；痛风	核糖核酸酶（RNA 酶）
红花子	木酚素糖苷；泻泻	β -葡萄糖苷酶
豆、小麦	植酸；矿物质缺乏	植酸酶
大豆	蛋白胰酶抑制剂；不能利用蛋白质	脲酶
蓖麻豆	蓖麻毒；呼吸和血管收缩系统麻痹	蛋白酶
各种食品	亚硝酸盐；致癌物	亚硝酸盐还原酶
各种食品	单宁；致癌物	单宁酶
咖啡	咖啡；亢奋	微生物嘌呤去甲基酶

第六节 酶工程提高食品资源利用效率

一、提高肉类和果蔬类生产效率

20 世纪 80 年代，随着牛的生长刺激因子（BST）的克隆成功和应用，菜牛的生长率约提高 15% 左右。20 世纪 80 年代末，又推广至猪的生长刺激因子的克隆与应用，它不仅可使猪的生长速度提高，商品猪上市时间由 6 个月缩短为 3 个月。在猪屠宰前 3 个月内施用，还可使猪的肥膘部分减少 1/3，瘦肉部分增加，单位体重耗用饲料量下降 1/4。鸡如果施用生长激素，也可使经济效益提高 15%。利用生物技术可以将鸡培育成适合烤鸡生产用的、生长快的大型鸡。牛的产乳刺激因子也被克隆入细菌，由细菌大量生产这种激素，施用于乳牛后使产乳率提高 15%~20%；奶羊产乳量提高 8%~12%。通过细胞杂交和细胞培养手段可培养出含水量大大降低的番茄、洋葱、马铃薯新品种，可延长货架期，节省加工时的蒸发能耗。培养出了自身带奶味和咸味的适于加工成膨化玉米的新品种，以适应低盐、低脂肪的消费要求。一家美国公司称其培育出了更甜、更脆、纤维素含量更少的芹菜、萝卜等蔬菜新品种。一些蔬菜水果中因为天然含有的氧化酶类基因较多，影响其收获后的加工质量，也可在育种中采用生物技术改善，另外还可应用生物技术将有毛的桃子培育成无毛的桃子，提高其食用品质和加工品质。

二、提高植物原料的淀粉提取率

常用淀粉质原料的种类有：①粮食类：大米、玉米、大麦、小麦、燕麦、高粱等。②薯类：马铃薯、甘薯、木薯等。③粮食加工副产物：米糠、麸皮、淀粉渣等。④野生植物：葛根、蕨根、橡子仁、石蒜等。

在湿法制造玉米淀粉时，干玉米常常在亚硫酸溶液中浸渍的适当时间里添加绿色木霉纤维素酶，可缩短浸渍时间，提高生产效率。当用 0.2% 亚硫酸水溶液浸渍玉米 6h 后，加 0.5% 的纤维素酶，浸渍时间可以从不加酶的 40~48h 缩短到 15~24h，而玉米淀粉的收率基本相同。

例如以马铃薯为原料提取淀粉时，常常得到 5%~10%（占原料淀粉）的淀粉渣，只能作饲料，干渣中含 40%~50% 的淀粉和 30%~40% 的纤维。将马铃薯淀粉渣，用三倍水稀释后，加 0.2% 纤维素酶，维持 40℃，搅拌处理 3h，淀粉的回收率为 98%。

在以甘薯为原料提取淀粉后的淀粉渣中，添加不同浓度的纤维素酶和软化酶液，保持温度 40℃，pH 调整为 4.5，经 300~500r/min 搅拌 1~4h 后，淀粉的回收率为 76%。

目前，在淀粉提取工业上应用酶法的还不普遍，因为酶的价格较高，淀粉的价格较低。随着酶制剂成本的降低，采用酶活力稳定条件，以淀粉渣中回收淀粉将会完全产业化。

三、酿酒工业与出酒率的提高

啤酒是以麦芽为原料，经糖化发酵而成的酒精饮料。大麦芽中含有各种酶类，主要为淀粉酶、蛋白酶、 β -葡萄糖酶、纤维素酶以及核酸分解酶等，可以用来发酵酿酒。由于制造麦芽时，原料大麦中淀粉呼吸损失浪费较多，也因为大麦质量受产地、气候变化的影响较大，而对啤酒质量的要求日益提高。麦芽在酿酒过程中可能出现不稳定，通过外加一种或多种酶制剂的方法可以改善这种缺陷。

添加酶制剂后，可以减少麦芽用量，提高原料利用率，提高辅料的比例，降低生产成本；还可以弥补低质量麦芽的缺陷，达到正常生产的目的；也可以完善啤酒风味，提高啤酒质量，延长保质期，降低啤酒的混浊、雾状沉淀和凝胶沉淀等。采用固定化蛋白酶处理啤酒，能控制啤酒中蛋白质的水解程度，防止泡沫稳定性的丧失。纤维素酶能够提高酒精和白酒的出酒率，特别是对野生淀粉质原料进行发酵时，需要纤维素酶和其他各种酶类，以提高淀粉利用率并降低醪液的黏度。其原因可能是：①对原料部分纤维素的分解，主要产物葡萄糖可供酵母利用。②对植物细胞的分解更利于淀粉的释放和利用。

常用的酶制剂还有枯草杆菌的耐高温 α -淀粉酶、切枝酶（普鲁兰酶）、木瓜蛋白酶和细菌蛋白酶，用它们可以提高麦汁中的 α -氨基氮；用 β -葡聚糖酶，可以改善麦汁的过滤性能；添加 α -乙酰乳酸脱羧酶等可以降低双乙酰含量，缩短啤酒成熟周期；添加枯草杆菌的蛋白酶防止酒混浊是有效的，混浊物的蛋白质被分解成为低分子肽，因此不再沉淀。

传统的啤酒后熟工艺需要三周左右的时间，严重地限制了生产能力。采用固定化酵母技术可大大缩短后熟时间，只需数天即可生产出符合产品质量要求的啤酒。将主发酵工艺制得的嫩啤酒流经装有固定化酵母的生物反应器，经过适当的时间，等到产品中的各项指标符合质量要求后，即可得到成品啤酒。

β -葡聚糖是一种黏性多糖，也是半纤维素的重要组成部分，它由葡萄糖单位以 β -1, 4-键连接而成。大麦原料中的 β -葡聚糖含量一般占干物质的 5%~8%，大麦发芽过程中大部分的 β -葡聚糖被新产生的 β -葡聚糖酶所降解，少量仍保留在麦芽内，在制麦芽汁时溶入糖化醪中。适量的 β -葡聚糖是构成啤酒酒体和泡沫的重要成分。但过量的 β -葡聚糖会使糖化醪的黏度升高，麦汁难于过滤，降低麦芽汁得率，并易造成麦芽汁浑浊。此外，过量的 β -葡聚糖进入发酵液后与蛋白质结合，使啤酒酵母容易产生早期沉淀，影响发酵的正常进行；还易形成啤酒的雾浊或早期凝胶沉淀，影响产品的品质。原料大麦中不含 β -葡聚糖酶，在发芽过程中会产生少量此酶并对 β -葡聚糖

进行降解作用。所以在使用因发芽欠佳而导致麦芽中 β -葡聚糖降解不足的麦芽,或使用较大麦芽作辅料时,就需要添加 β -葡聚糖酶来降低糖化醪中的 β -葡聚糖含量,以保证糖化和发酵的正常进行。

双乙酰(即丁二酮)的含量是影响啤酒风味的重要因素,是品评啤酒成熟与否的主要依据,对啤酒质量具有决定性的影响。双乙酰的口味界限值很低,仅为 $0.1\sim 0.15\text{mg/L}$,超过此阈值会使啤酒带有不愉快的馊饭味。双乙酰是啤酒在发酵过程中形成的代谢副产物,一般认为它是由前体物质 α -乙酰乳酸经非酶氧化脱羧形成。加入 α -乙酰乳酸脱羧酶可使 α -乙酰乳酸转化为3-羟基丙酮,从而有效地降低啤酒中双乙酰的含量,加快啤酒的成熟。 α -乙酰乳酸脱羧酶的用量应根据酶活力的大小和酵母活性的高低来决定,以保证成品啤酒中双乙酰的含量控制在 0.1mg/L ,且不影响啤酒的口感和其他理化指标。

果酒酿造中,采用酸性蛋白酶、淀粉酶、果胶酶可以清除混浊或改善溃碎果实压榨操作,果胶酶等可以有助于果实组织细胞破碎,充分释放果汁,所以有利于提高出酒率。

白酒生产中,采用糖化酶代替麸曲可以提高出酒率 $2\%\sim 7\%$,节约粮食,简化设备和节省厂房占地。在淀粉质原料中添加纤维素酶,可提高出酒率 1% 以上。

黄酒生产中,应用糖化酶,也可以提高出酒率,缩短发酵周期。

四、提高农副产品和城市废料中纤维素的利用率

农产物秸秆资源丰富,而且是可以年年再生的有机物质。我国农产物秸秆每年有 $5\sim 6$ 亿t之多,其中大多数废弃于田间地头,产生严重浪费和污染环境现象。城市废旧报纸、纸板等也有相当数量,啤酒厂的酿酒下脚料、植物油厂的炼油下脚料等,均亟待开发利用。这类废弃物主要由纤维素、半纤维素、木质素三大部分组成。通过纤维素酶可以将纤维素转化为葡萄糖、单细胞蛋白和酒精等食品原料和能源,对废物利用有着重要意义。用纤维素酶的催化反应代替高温、高压的化学反应,可达到节能、代粮、降低成本和革新工艺的目的,目前已取得了一定成效。麦秸、麦糠、稻草、玉米芯中的一部分纤维素可用酶被转化为糖、菌体蛋白、脂肪等,可以降低饲料中的粗纤维含量,提高粗饲料的利用价值;半纤维素可以水解为木糖;木质素是一种苯酚类的高聚物,可分解为苯酚、苯及燃料。近年来,国内正努力开发饲料用复合酶,它主要以纤维素酶为主,另加蛋白酶、果胶酶、半纤维素酶、淀粉酶、溶菌酶等,当它添加入饲料中,能大幅度提高秸秆的可消化性和营养价值。

五、提高肉类和鱼类的利用率

(一) 肉类的嫩化

老牛肉及其他质地较差的老动物肉,其结缔组织和肌纤维中的胶原蛋白及弹性蛋白含量高而且结构复杂。胶原蛋白是纤维蛋白通过副键连接成为具有很强机械强度的组织,它的交联键可分为耐热和不耐热两种。幼龄动物的胶原蛋白中,不耐热交联键多,一经加热即行破裂,肉显得很嫩。而老动物肉因耐热键多,难以煮烂,肉质坚韧粗糙,口感非常差。采用木瓜蛋白酶、菠萝蛋

白酶、米曲霉或胰酶等酶制剂处理,可以改善此类肉类。老牛肉、老猪肉和老家禽类肉均可使用此方法。软化方法有两种,一种是在宰前静脉注射酶液法;二是用酶涂抹肉表面或用酶液浸渍软化。在肉类加工的过程中应用酶法也可以软化。在咸牛肉罐头、烤猪肉串、烩烧内脏等肉食品加工中也用酶嫩化法。老家畜肉用酶嫩化后也可有效制成腊肉和火腿等食品。酶的用量一般占肉重的 $1/20\ 000\sim 1/30\ 000$ 为宜,过多使用时,肉会过分软化。一般在配制注射用的盐水溶液时,在其中溶解蛋白酶,让它均匀渗透进入肉块,在 $3\sim 5^{\circ}\text{C}$ 冷藏数天后,移入下道加工工序。烹调时,如果在切细老肉中,预先加入酶液,使混合均匀后,再加热即可。酶技术对改善坚硬肉或老家畜肉的质地,增强肉制品风味很有效果,也使老肉的软化的利用率得到大大提高。

(二) 提高杂鱼、碎肉等废弃蛋白的转化率

将废弃蛋白,例如杂鱼、动物血、碎血等,用蛋白酶水解,抽提其中蛋白质以供食用或作饲料,是增加人类蛋白质资源的一项有效措施。海洋中能食用的鱼类只占20%左右,许多鱼类因其色泽、外观或滋味不佳而不能食用。杂鱼和鱼厂废弃物的酶法利用很有前途,采用蛋白酶将其中大部分蛋白质溶解后,经浓缩干制成含氮量高,富含各种维生素和矿物质的产品,添加于面包、面条等各种食品中,或者直接制成饲料等,均具有潜在经济价值。利用碱性蛋白酶水解动物血,脱色后制成无色血粉,作为廉价而安全的补充蛋白质资源,已投入工业化大生产。

解冻后的鱼类腥味很大,用酸性蛋白酶在pH中性时处理,可以脱腥。用微生物酸性蛋白酶处理碎皮,萃取后可得到可溶性胶原,这种可溶性胶原纤维遇盐或洗衣粉时便再生析出,可制人造肠衣。应用酶技术来提高废弃蛋白的利用率具有广阔的前程。

六、酶与提高发泡剂的保存质量

食品工业常用的发泡剂是干蛋白。禽蛋中含有微量的葡萄糖,葡萄糖的醛基具有很高的反应活性,容易与蛋白质、氨基酸等物质中的氨基发生羰氨反应,使蛋白在干燥和贮藏过程中发生褐变,从而使其溶解度降低,起泡力和泡沫稳定性下降。为了防止这种劣变,必须将葡萄糖除去。传统上去除葡萄糖,使用酵母或自然发酵法,但这种方法时间长,品质不易保证。现在采用葡萄糖氧化酶处理,使葡萄糖氧化成葡萄糖酸。该法除糖效率较高,1分子葡萄糖氧化酶在1min可催化氧化3.4万个葡萄糖分子,周期短,产品质量和效率提高。

七、提高干酪的生产效率

全世界干酪生产所耗牛奶占总产量的 $1/4$ 。在生产中,先用乳酸菌将牛奶发酵制成酸奶,然后加凝乳酶水解酪蛋白,在酸性条件下,钙离子使酪蛋白凝固,再经切块加热压榨熟化而成。凝乳酶原来来自小牛,全世界因此而平均每年宰杀小牛多达4000万头。随着酶技术的发展,现在已有85%的动物酶已由微生物酶所代替。微生物凝乳酶的凝乳作用强而蛋白质分解作用弱。目前,采用基因工程将牛的凝乳酶原基因植入大肠杆菌已表达成功,用发酵法已经可以生产凝乳酶。

八、酶与提高酿造产品的得率及原料利用率

在酱油酿造业，不需要新设备，不必另行设置分解槽，利用现有设备，采用简单的操作就能使用酶法生产。使用纤维素酶制剂后，可以使生产效率迅速提高（速酿），与传统的酱油酿造方法相比，酿造周期能缩短 1~3 个月，故可以增加发酵池的周转率。并且因为用曲量减半，用以前的制曲设备，同样人员，同样天数，投料量可以提高一倍以上。由于应用酶制剂，促进了原料的消化，故原料利用率、氮利用率得以提高，浓度得以提高，产量也得到提高。由于制曲量的减半，碳源损失少，约能节减小麦 20%。在酿造过程中，由于准确地添加酵母菌、乳酸菌或种醪等，所以能正确地控制醪的成熟，更能稳定均一地酿造。

酱油酿造中必需的酶是：参与原料中氮溶解的蛋白酶、参与氨基酸生成的氨肽酶（ ≥ 0.8 IU/g）、参与糖化的 α -淀粉酶（ ≥ 4000 IU/g）和能使酱油醪黏度降低的羧甲基纤维素酶（ ≥ 60 IU/g）。市售的各种蛋白酶、氨肽酶、 α -淀粉酶和羧甲基纤维素酶都能有效地利用。米曲霉所产生的酶基本上能代替上述四种酶中的任何一种。

酶制剂在酱油酿造中使用，可比传统方法减少一半以上的曲，用冷的高浓度盐水（28%~30%）在发酵槽中浸渍 2~3d。脱脂大豆和小麦的前处理方法与传统方法相同，处理后，将其与含酶制剂的高浓度食盐水（28%~30%）溶液边混合边进料，在 35~40℃ 静止 2~3d 进行消化后，再与曲一同搅拌混合，使它温酿成熟。

豆酱、面酱和米酱等是古老的发酵食品，是由曲霉产生的多种酶（蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶等）都参与了作用，具有独特的香味。由于每次所得的酶活性有所差异，难免使酿造时间和品质发生波动。如果将必须使用的廉价微生物酶的种类和用量确定下来，就可以代替用曲，并且避免了用曲的缺点。这样可以因为酶的活力及组成固定于一定范围，并能防止传统制曲时混入杂菌而引起的风味不正，使产品质量稳定。增加酶制剂用量时，能够缩短成熟期。传统方法制曲时，损失约为原料的 10%；采用酶制剂代替时，因为没有制曲损失，所以产品的收得率可得到一定量增加，但酱的成熟仅用一种酶或几种酶是不够的，适宜制酱的完全复合酶制剂还有待于开发和完善。

九、酶技术使淀粉的转化利用率更高

淀粉含量高的植物原料在食品原料中占有相当比重。将该类原料或淀粉加工转化成系列的淀粉类食品，使酶工程技术在工业生产规模上取得了较大的成功。淀粉转化成的淀粉类食品常有糊精、环状糊精、饴糖、麦芽糖、葡萄糖、果糖、低聚麦芽糖等。常用的酶有 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、支链淀粉酶和葡萄糖异构酶等，其中利用固定化葡萄糖异构酶生产高果糖浆，这是目前酶工程技术应用最为成功的产品。一些发达国家淀粉的深加工转化率已达 94% 以上。我国淀粉的深加工转化率还有一定的距离。我国食糖的生产不能满足需要，发展酶法生产淀粉糖类产品的转化，可以大大提高淀粉的转化率。生产高果糖浆时，常规使用 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶先后将淀粉液化和糖化、浓缩后，再经固定化葡萄糖异构酶异构化，再经纯化等工序后可

制得产品。饴糖是我国的传统食品，目前的饴糖生产，已趋向于用酶法代替传统的大麦芽法，亦即直接添加 α -淀粉酶和 β -淀粉酶为糖化剂制取，提高了产品质量和生产效率。糊精是淀粉的低程度水解产物，其DE值在10~20，它在食品工业中是良好的增稠剂、填充剂和吸收剂，广泛应用于食品、饮料、糖果和罐头中。过去生产糊精采用酸法，现在则采用耐高温 α -淀粉酶法生产。环状糊精（简称CD）是由6~12个葡萄糖单位以 α -1,4-葡萄糖苷键连接而成的一类环状结构化合物，它们能吸附各种小分子物质，起到稳定、缓释、乳化、提高溶解度和分散度等作用，在食品工业中具有广泛用途。一般先将淀粉用 α -淀粉酶液化，再用环状糊精葡萄糖基转移酶（简称CGT酶）作用而制得。葡萄糖是淀粉完全水解的产物，目前国内外生产葡萄糖均采用酶法代替了过去的酸法，常用耐高温 α -淀粉酶和高转化率糖化酶来生产，产品质量比较稳定。目前产量最大的功能性低聚糖分为麦芽低聚糖和异麦芽低聚糖，它们的突出优点是具有预防龋齿和促进人体内双歧杆菌的增殖等诸多保健功能。麦芽低聚糖的生产一般先用 α -淀粉酶将淀粉液化，再用低聚糖酶糖化，再经纯化、成型等工序制成成品。异麦芽低聚糖则先用 α -淀粉酶液化，再用 β -淀粉酶糖化，同时用葡萄糖转移酶（ α -淀粉酶）将麦芽糖转化成为异麦芽低聚糖，酶技术的发展会使淀粉的转化利用率更高。

十、酶制剂与提高茶叶等原料中有效成分的得率

速溶茶饮用方便，可用其他饮料调用，要求速溶后没有不溶解的渣滓。茶叶的有效成分包括具有香味的氨基酸、碳水化合物、有苦味的咖啡因、配糖体、有涩味的单宁和其他香气成分所构成。茶叶的这些有效成分几乎都被以纤维素为主体的细胞膜所包围，这些细胞之间还有原果胶粘连而构成。用木霉或黑曲霉的纤维素酶加入到茶叶的低温抽提液中后，比不加酶的对照的浸取提取率增加20%~50%，过滤可得到绿色和香气浓的滤液，加适当物质干燥后，制成粉末即为高品质速溶茶。

十一、酶制剂与提高豆制品的得率

纤维素酶用于处理大豆，可促进其脱皮，增加从大豆或豆饼中提取优质水溶性蛋白质的得率，也可用于回收豆渣中的蛋白质和油脂，纤维素酶用于豆类制品加工，可缩短时间，提高质量。豆浆和豆腐是传统的豆制品，它们均是以大豆为原料制成的重要大豆蛋白质食品，在常规生产中，添加以纤维素酶为主体的复合酶制剂后，豆浆或豆腐的产量均可增加10%以上。该酶制剂以用黑曲霉与根霉所制得的为好。

以上酶法替代传统盐法和酸法凝固豆乳制作豆腐、豆腐乳坯及豆乳干酪时，整个制作周期可相对缩短20%以上，而且成品质量与传统方法生产的无明显差异，尽管酶法凝固得到的凝胶在网络结构上要比盐法（ $MgCl_2$ 法）的弱些，弹性和脆度上也低一些。一般认为，来源于毛霉的豆乳凝固酶具有较高的豆乳凝固酶活力。从发展趋势上看随着固定化酶反应器的开发应用，酶法生产可以彻底革新传统的生产工艺，实现自动化控制和生产，提高产品的品位和卫生指标，使中国腐乳、豆腐等产品走向更广阔的国际市场。适量的蛋白酶处理，还可以脱除豆腥味。

十二、酶制剂与草莓、辣椒等除蒂率的提高

草莓、辣椒等原料在各自加工过程中必须除蒂，用手工操作不能大量处理，速度太慢，用酶制剂处理可以提高除蒂效率。将用水洗净的草莓果子经挤压破碎后，添加 0.2% 黑曲霉生产的果胶酶搅拌后在 40℃ 放置 20min，然后用 8mm×8mm 孔的过筛机除去蒂，果肉经 95℃ 处理 5min，得到黏稠状的草莓果肉。由于曲霉菌制得的果胶酶制剂中，以果胶酶为主，还混有半纤维素酶和少量纤维素酶，三种酶活同时起作用，就大大提高了去蒂效率。

十三、酶制剂与琼脂生产

传统上用酸和热处理的方法提取琼脂，会引起琼脂的分解，而用纤维素酶处理，可避免此类分解，而且因酶对细胞壁的降解，可提高得率，简化工艺。

十四、其他用途

某些蔬菜、水果经纤维素酶、果胶酶等酶制剂处理后，可使细胞壁膨胀、软化，提高可消化性和改进食感；用于果汁生产时，可以提高出汁率，也可以提高果酒的得率。另外，在生产脱水蔬菜如土豆、胡萝卜时，若经适当的纤维素酶处理后，再干燥脱水，可改进脱水蔬菜的复原性和烧煮性。采用酶制剂生产方法可以提高天然酸味剂、鲜味剂、甜味剂、食用香料和色素、增稠剂等食品添加剂的收得率。

在香料的生产中，用纤维素酶处理后，再提取芳香油和香料，有利于香料在提取液中的扩散和分配，从而增加得率，提高芳香油和香料的产量。总之，在提高原料利用率和产品质量、降低成本上，仍然需要进一步开发和完善酶制剂的生产，尤其降低某些酶制剂的生产成本，使其更广泛地应用于工业化大生产。啤酒用酶、淀粉加工用酶、果汁加工用酶等酶制剂的生产技术还需完善和提高，并使其达到食品级标准。新型甜味剂、酸味剂、维生素、调味剂等各种新产品所需的酶制剂，也亟待人们去开发和改造，酶的应用和开发潜力很大，前景十分广阔。

第七节 新型酶制剂及其应用

一、微生物原果胶酶的研究进展

原果胶酶 (protopectinase) 是指可以催化原果胶水解的酶。1978 年日本学者 Sakai 等从酵母中发现了产生原果胶酶的菌株。目前已从细菌、酵母、霉菌中筛选到产酶菌株。

(一) 微生物原果胶酶的作用机理

果胶是一种杂多糖类高分子化合物，D-半乳糖醛酸 (或部分甲酯化的 D-半乳糖醛酸) 通过 α -1, 4-糖苷键连成主链，在主链中常间或地插入了一些 α -L-吡喃鼠李糖残基、阿拉伯聚糖、半乳

聚糖、阿拉伯半乳糖等形成侧链，将果胶分子与蛋白质、半纤维素以及纤维素连在一起，形成不溶性的原果胶。一般认为，在植物细胞壁中的原果胶是由同型半乳糖醛酸区（光滑区）以及带有中性糖侧链的鼠李聚糖半乳糖醛酸骨架（发区）组成，通过原果胶适当地降解可生成果胶与果胶酸（图 4-18）。

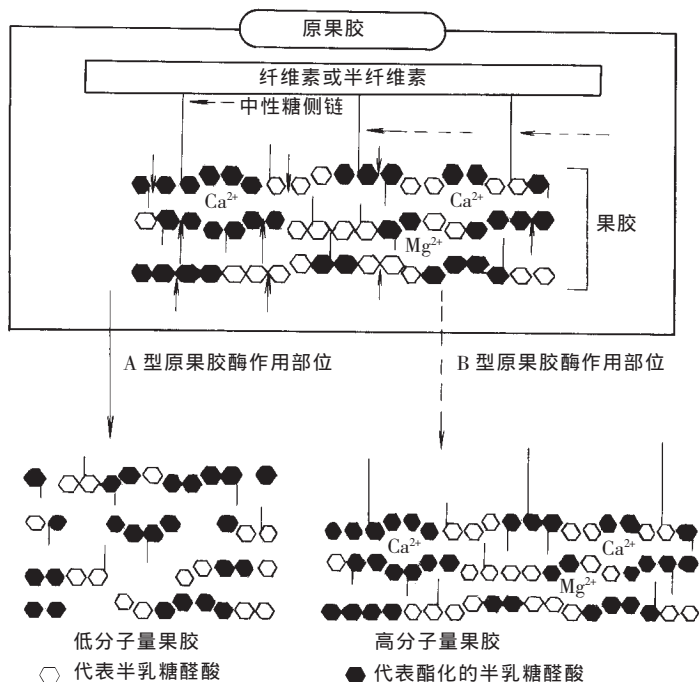


图 4-18 原果胶酶作用机制图解

到目前为止，所研究的一些微生物原果胶酶依其作用机理可分为两类：A 型原果胶酶和 B 型原果胶酶。

1. A 型原果胶酶 其主要作用于原果胶分子中的“光滑区”。迄今为止，发现了 A_1 型和 A_2 型两类 A 型原果胶酶。

(1) A_1 型原果胶酶。这类酶是一类内多聚半乳糖醛酸酶，能水解多聚半乳糖醛酸，对各种来源的原果胶分子均有作用。现已从一些酵母以及酵母状真菌中分离到 A_1 型原果胶酶，如在脆壁克鲁维酵母 (*Kluyvermyces fragilis*) IFO₀₂₈₈、里氏半乳糖霉 (*Galactomyces reessii*) 和帚状丝孢酵母 (*Trichosporon penicillatum*) SN₀₃ 发酵液中结晶分离出这类酶，依次称为 PPase-F、PPase-L 和 PPase-S。另外，在一些霉菌，如泡盛酵母 (*Aspergillus awamori*) 的发酵液中也分离纯化到这种酶。

(2) A_2 型原果胶酶。Sakamoto 等从枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) IFO₃₁₃₄ 的发酵液中分离到两种 A_2 型原果胶酶：PPase-N 和 PPase-R，PPase-N 能通过反式消去反应断开聚半乳糖醛酸链，而 PPase-R 对聚甲酯化半乳糖醛酸表现出很强的活性。

2. B型原果胶酶 其作用于原果胶分子中“发区”中的不同部位，这类酶对底物的作用专一性较强。Sakai等在枯草芽孢杆菌发酵液中发现了原果胶酶 PPase-C，这种酶能断开阿拉伯半乳糖中 α -1, 5-L-阿拉伯呋喃糖苷与阿拉伯聚糖间的键，切断果胶与细胞壁间的连接，释放果胶。PPase-C对甜菜根和苹果皮中的原果胶有很强的作用活性。此外，从血红栓菌 (*Trameetes sanguinea*) 纯化到一种原果胶酶 PPase-T，能断开原果胶分子中半乳糖吡喃酰 (galactopyranosyl) 与鼠李糖吡喃酰 (rhamnopyranosyl) 的连接。PPase-T对 Hassaku 柑橘皮以及胡萝卜中的原果胶有很强的作用活性，但当它作用于甜菜根以及苹果皮中的原果胶时，活性不高。

(二) 微生物原果胶酶的酶学性质的研究

原果胶酶是微生物产生的胞外酶，各种微生物原果胶酶主要酶学性质见表 4-5。

表 4-5 几种主要微生物原果胶酶的酶学性质

原果胶酶	分子量	等电点	最适 pH	最适温度 (°C)	热稳定性 (°C)	pH 稳定性	抑制剂
PPase-F	33 000*	5.0	5.0	60	—	2~8	Hg ²⁺ , Hg ⁺ , Ba ²⁺ , Ag ⁺ , Ca ²⁺ , Pb ²⁺
PPase-L	30 000*	8.4~8.5	5.0	55	—	3~7	Hg ²⁺ , Hg ⁺ , Ba ²⁺ , Ca ²⁺ , C ₆ O ²⁺
PPase-S	30 000*	7.6~7.8	5.0	50	—	3~7	Hg ²⁺ , Hg ⁺ , Ba ²⁺ , Ca ²⁺ , C ₆ O ²⁺
PPase-N	32 000*	9.4	8.0 ^a	60 ^b	60	3~10 ^c	EDTA, Hg ²⁺ , Mn ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Ba ²⁺
PPase-R	27 000*	8.2	8.0 ^a	60 ^b	60	4~11 ^c	Hg ²⁺
PPase-C	30 000 [#]	9.0	6.0 ^a	60 ^b	60	5~9 ^c	Ag ⁺ , Fe ³⁺ , Hg ²⁺ , Mn ²⁺ , Sn ²⁺
PPase-T	55 000 [#]	8.1	4.0 ^a	60 ^b	60	2~6 ^c	Ag ⁺ , Ca ²⁺

*. 以凝胶过滤的方法测得；#. 通过 SDS—PAGB 电泳的方法测得；a. 在 T=37°C 下测定；b. 在 pH=6.0 下测定；c. 在 T=37°C 下 16h 测定。

此外，Sakai 等还进行 A₁ 型原果胶酶 (A₁-PPase) 以及 *Aureobasidium pullulans* 中内聚半乳糖醛酸酶 (Pgase-AY) 对原果胶以及聚半乳糖醛酸的亲和力研究。Pgase-AY 降解多聚半乳糖醛酸的作用很强，但对原果胶的作用很弱。尽管 A₁-PPase 与 Pgase-AY 对聚半乳糖醛酸有几乎相同的 K_m 值，但它们对原果胶的 K_m 却有很大的差异，Pgase-AY 几乎高出 A₁-PPase 一个数量级。

(三) 微生物原果胶酶的应用

微生物原果胶酶自发现至今已有二十多年，到目前为止关于它的应用研究，主要可归纳为以下几个方面。

1. 果胶生产 传统的工业化生产果胶主要是酸提取法。然而这一加工过程存在一些不足：残渣分离困难，设备易被腐蚀，能源消耗很大，同时还产生大量酸性废弃物对环境造成污染。利用原果胶酶能催化原果胶水解生成果胶这一性质，Sakai 等发明了利用产原果胶酶的酵母酶法生产果胶的工艺。除了果胶产品中含有较多的中性糖外，酶法生产的果胶分子量较大，质量稳定，果胶提取完全，发酵液中果皮不破碎，也不需进行热、酸处理，产品容易分离。该技术能有效地避免传统工业生产果胶的不足，并已被申请专利。

2. 单细胞食品的制备 原果胶酶，尤其是帚状丝孢酵母 (*T. penicillatum*)、泡盛酵母 (*A. awamori*) 以及枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 中的原果胶酶，能作用于植物组织产生松散的单细胞。酶处理的蔬菜组织所获得的单细胞，细胞完整，各种营养成分保存完好，表面及内部的张力较小而易与牛奶、酸奶、冰激凌、汤等混合，且易被胃蛋白酶以及胰凝乳蛋白酶消化，适宜

用作老人、婴儿以及病人的食品；细胞规格统一能赋予食品光滑的质地。

此外，原果胶酶还可以用于植物原生质体的制备，Mitsui 等利用原果胶酶成功地制成了多种单子叶植物的叶肉原生质体。

二、转谷氨酰胺酶的功能特性及其应用

转谷氨酰胺酶 (EC2.3.2.13) 可通过催化转酰胺作用，使蛋白质或多肽之间发生交联反应。20 世纪 50 年代末，Waelsh 等从豚鼠中提取到有活性的转谷氨酰胺酶，经过进一步研究发现这是一种 Ca^{2+} 依赖型转谷氨酰胺酶，主要催化转酰胺基反应。1989 年，日本学者 Ando 等经过大量筛选，从链轮丝菌属 (*Streptoverticillium*) 中提取到了微生物来源的转谷氨酰胺酶 (microbial transglutaminase, MTG)。该酶为非钙离子依赖型酶，功能与动物来源的转谷氨酰胺酶很相似。微生物产生的转谷氨酰胺酶具有许多优点：热稳定性好，pH 范围广，并且对 Ca^{2+} 无依赖性。

转酰胺反应的酰基供体为蛋白质或多肽链上谷氨酰胺残基的 γ -羟基酰胺基，受体可以为蛋白质肽链上赖氨酸残基的 ϵ -氨基、游离氨基酸的 ϵ -氨基和初级氨或水。转谷氨酰胺酶所催化的反应既可以发生在分子间，也可以发生在分子内，决定分子间交联反应程度的因素主要为蛋白质本身的构象以及转谷氨酰胺酶的类型。

(一) 转谷氨酰胺酶的功能特性

1. 成胶特性 转谷氨酰胺酶具有成胶特性，表现在：①使未加热状态的各种食品蛋白质成胶；②赋予不能成胶的蛋白质（如乳蛋白）成胶；③提高成胶的黏弹性；④形成耐热性、耐酸性及耐水性等稳定性高的胶体；⑤一般情况下所形成的胶体强度会随转谷氨酰胺酶的添加量增加而增加。但是添加过多的转谷氨酰胺酶会导致凝胶强度的降低。Asagani 等研究发现在转谷氨酰胺酶浓度接近 0.03% 时，鱼肉膏凝胶胶体强度达最大值，酶添加量再增加，其强度反而降低。

2. 改善乳化性 转谷氨酰胺酶可以改善蛋白质的乳化性质。Mingia 等检测了交联 β -酪蛋白的乳化特性，发现乳化活度指数降低了，但是乳化液稳定性却随着聚合程度增加而增加；检测单质 β -酪蛋白和 β -酪蛋白聚合物混合液的稳定性，发现随着混合液中聚合物比例的增大，该混合液的乳化稳定性增加。

3. 提高发泡性能 WPI 大豆 11S 球蛋白混合物的发泡稳定性较低，经过转谷氨酰胺酶处理过的 WPI 大豆 11S 球蛋白具有良好的稳定性。这可能是由于 WPI 和大豆 11S 球蛋白形成的聚合物分子中紧密二级结构和三级结构很少，它所具有柔韧的无规则的蛋白质更易形成泡沫，稳定性也更好。此外，由于交联作用而使蛋白质流动性提高，赖氨酸残基上氨基电荷的去除也有利于增加泡沫的稳定性。

4. 增强蛋白质溶液的黏稠性 蛋白质经聚合分子量增加后，其溶液的黏度通常也会增强，因此经过转谷氨酰胺酶处理过的蛋白质溶液往往具有较高的黏度。

5. 提高凝胶的持水性 转谷氨酰胺酶催化形成的 Glu-Lys 键可提高凝胶的持水性能，使浓度为 2% 的蛋白质溶液也可以胶体化。这主要是因为所形成的胶连键使蛋白质形成复杂的、严密

的空间网络结构,对水分的束缚包容能力增强。例如利用转谷氨酰胺酶就可以解决食品胶的脱水收缩问题,香肠和酪乳等经转谷氨酰胺酶处理后,其脱水收缩现象就可被抑制。

6. 提高蛋白质的热稳定性 加热处理容易使蛋白质变性,并降低其功能特性。但是通过转谷氨酰胺酶发生交联所产生的 Glur-Lys 共价结合键,热稳定性较高,因此增强了蛋白质网络强度和凝胶断裂强度。此外,经过转谷氨酰胺酶催化交联的 β -乳球蛋白同样表现出较高的热稳定性,1%的聚合 β -乳球蛋白即使在 100℃ 的环境下也可持续 30min 也不变性,而天然 β -乳球蛋白在 70℃ 时就很快变性。

(二) 转谷氨酰胺酶在食品中的应用

转谷氨酰胺酶在肉制品和乳制品中的应用情况在本章第二节已有介绍,除此之外,转谷氨酰胺酶在其他食品领域还具有广泛的应用。

1. 提高产品率 J.F.Kerry 证明了以禽胸脯肉为原料,加入大豆蛋白和转谷氨酰胺酶,能够提高产品出率。这是因为通过 Glur-Lys 键的连接提高了制品中凝胶网络稳定性和抗热能力,使产品能够在热处理中降低蒸煮损失。此外,利用转谷氨酰胺酶处理香肠制品,可以避免香肠脱水收缩现象的发生。

2. 低过敏原蛋白基材 牛奶中的酪蛋白和乳清成分都有过敏原活性,通过转谷氨酰胺酶可以选择性地修饰抗原决定簇中的谷氨酰胺基,改变抗原决定簇的结构,阻止其与抗体的结合,减少抗原性。

3. 在保健食品中的应用 转谷氨酰胺酶交联蛋白质可作为脂肪的取代物。因此 Novo 公司以肉制品常用的乳化剂酪蛋白酸钠为原料,经转谷氨酰胺酶作用得到脂肪取代物。将其应用于色拉米香肠中可取代 50% 的脂肪,而产品原有质构和风味不变。

4. 在水产品中的应用 转谷氨酰胺酶在水产品中添加可以提高其可塑性与柔韧性,因此广泛应用于鱼糕、鱼丸等产品。对马鲛鱼及鲟鱼制成的鱼糜蛋白研究表明,添加转谷氨酰胺酶对香肠的凝胶强度有明显的提高。对马鲛鱼鱼糜蛋白最适的转谷氨酰胺酶添加量为 0.3IU/g;对鲟鱼鱼糜蛋白的最佳添加量为 20IU/g。SDS-PAGE 电泳证明,转谷氨酰胺酶作用后,在肌球蛋白重链间形成了分子内及分子间连接。

5. 在植物蛋白制品中的应用 转谷氨酰胺酶也可应用于植物蛋白制品中。利用转谷氨酰胺酶结合蛋白质功能,将赖氨酸导入谷类食品的蛋白质中,可以加工强化必需氨基酸食品,从而提高蛋白质效价,改善产品营养特性。Ikara 和 Iwani 通过转谷氨酰胺酶将赖氨酸交联到面筋蛋白、酪蛋白和大豆蛋白上,其中与面筋蛋白交联最为有效。1992 年 Faergemand 研究表明,转谷氨酰胺酶不能改善优质小麦面团性质,但能够增加低质小麦面包体积和改善其组织结构。

三、 α -乙酰乳酸脱羧酶

(一) α -乙酰乳酸脱羧酶作用原理

α -乙酰乳酸脱羧酶 (α -acetolactate decarboxylase, ALDC, EC4.1.1.5) 可以将 α -乙酰乳酸直接脱羧转化成乙偶姻 (acetoin), 而不经形成双乙酰的步骤。双乙酰 (diacetyl) 主要是啤酒酵母代谢的产物,由 α -乙酰乳酸 (α -acetolactate) 经非酶氧化脱羧产生。双乙酰对酒的口味有不良的

影响，酵母的双乙酰还原酶能够将其还原成乙偶姻，再由乙偶姻还原酶还原为 2,3-丁二醇。乙偶姻和 2,3-丁二醇几乎不影响啤酒风味。因此，把双乙酰含量降到阈值以下是啤酒熟化期的主要目的。双乙酰的形成与消除过程见图 4-19。

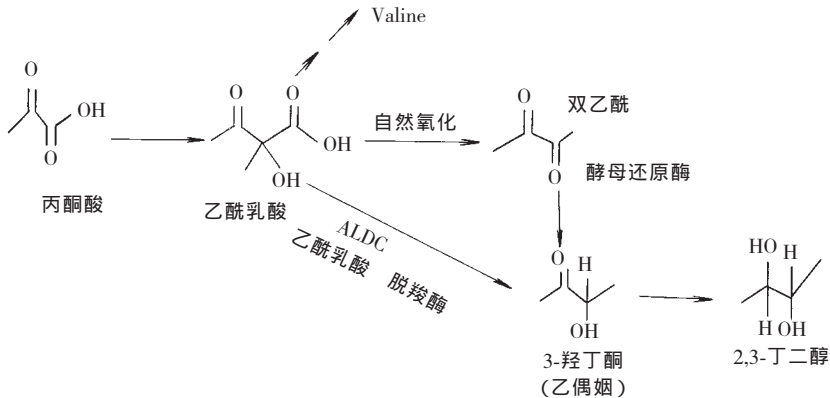


图 4-19 双乙酰的形成与消除

α -乙酰乳酸的非酶氧化脱羧比双乙酰被还原的速度慢得多（后者约为前者的 10 倍），所以对啤酒熟化过程的时间起着限制作用。如果在啤酒的熟化阶段 α -乙酰乳酸不能充分除去，在随后的包装、杀菌过程中就会有较多的双乙酰形成，从而影响啤酒风味。若将 α -乙酰乳酸脱羧酶用于啤酒生产，可以大大缩短啤酒熟化期，提高设备的利用率并且节省能源，具有一定的经济效益。

(二) α -乙酰乳酸脱羧酶在啤酒中的应用研究

啤酒的风味成分有很多，其中双乙酰的含量直接影响啤酒的风味成熟。在成品啤酒中，双乙酰的浓度如果超过 0.15mg/kg ，就会对啤酒的风味造成有馊饭味的不良影响。因此，把啤酒中双乙酰含量降至口味阈值以下，被普遍认为是啤酒成熟过程的主要目标。

黄秀鸾对 α -乙酰乳酸脱羧酶在啤酒中的添加量进行了研究，他们按每 100m^3 冷麦汁中添加 0.3L α -乙酰乳酸酶的比例进行生产，使生产周期由 22d 降至 $10\sim 12\text{d}$ ，啤酒酒龄控制在 $10\sim 14\text{d}$ 之内，所得的酒不但双乙酰合格，而且在口感与理化指标上，与酒龄 22d 的酒没有多少差异，啤体和谐，醇厚柔和。

据杨晓东等的研究，使用进口和国产的 ALDC 应用于不同的麦汁和不同代数酵母的情况下，均能迅速有效地还原双乙酰，有效地防止成品酒中双乙酰回升。此外，使用国产 ALDC 可以显著地节约生产成本。

陈晓瑜等在研究中对酒龄不足 18d 的发酵批次，添加 α -乙酰乳酸脱羧酶量为 4×10^{-6} ，同时以未加 α -乙酰乳酸脱羧酶的清酒样做对照。研究结果为，添加 α -乙酰乳酸脱羧酶可以有效地防止双乙酰的反弹现象。马茂荣等同样证明了在啤酒中添加 α -乙酰乳酸脱羧酶对降低发酵液中双乙酰含量作用十分明显。

伊东等对两种重组的 α -乙酰乳酸脱羧酶在啤酒中的应用情况进行了研究，结果表明，利用已

构建的含有短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis*) 和产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) α -乙酰乳酸脱羧酶基因的工程菌株,使它们分别在大肠杆菌中高效表达,获得重组 α -ALDC。实验中添加两种重组 α -ALDC 后,使啤酒中的双乙酰含量快速下降到或始终保持在 0.1mg/L 以下。目前国外已有多数 α -ALDC 基因被克隆,国内也克隆了来自短芽孢杆菌的 α -ALDC。

陈炜等在 α -乙酰乳酸脱羧酶生产菌的研究中共筛选 34 株菌。其中 14 株具有明显的 ALDC 活性,包括 12 株地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*), 1 株短芽孢杆菌 (*B. brevis*) 和 1 株乙酰短杆菌 (*Brevibacterium acetylicum*), 这说明地衣芽孢杆菌中产 ALDC 的菌比例较高。

四、氨肽酶和羧肽酶及其在蛋白水解物脱苦中的应用

(一) 蛋白水解物苦味产生的原因

蛋白质水解后经常表现出苦味,其原因是形成了苦味肽,许多研究者已经研究确认末端含有疏水性氨基酸的苦味肽是水解产物产生苦味的主要原因。在完整的球蛋白分子中,大部分疏水性侧链藏在内部,它们不接触味蕾,所以感觉不到苦味。当蛋白质水解成小分子的多肽时,肽链含有的疏水性氨基酸充分暴露出来,接触味蕾产生苦味。随水解进程的继续,越来越多的疏水氨基酸侧链暴露出来使苦味增加。能够产生苦味的氨基酸约有 8 种,分别为缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、精氨酸和组氨酸。水解蛋白质苦味的强弱与蛋白质来源、种类及水解程度等密切相关:

1. 与疏水氨基酸的含量、序列及其所处的位置和空间结构等有密切的关系 蛋白质中疏水氨基酸含量越高,水解后产生苦味的可能性越大。
2. 与肽链分子量的大小有关 一般分子量大于 5 000 的大豆多肽没有苦味,分子量在 500~1 000 的大豆多肽苦味最强。当大豆蛋白水解度约为 25% 时,大豆多肽混合物分子量绝大多数在 500~1 000 之间。
3. 与酶的来源和种类之间也有一定的关系 蛋白质水解物中含有的苦肽会随蛋白质种类以及水解所用的内切型蛋白酶的种类不同而有所不同。

(二) 氨肽酶和羧肽酶的脱苦作用

蛋白水解物的苦味脱除方法至目前为止主要有选择性分离法、掩盖法、类蛋白反应、膜分离法及酶法。以上各种脱苦方法各有利弊,其中最受关注和研究的最多的为酶法脱苦。所谓酶法脱苦即采用蛋白酶作用于苦味肽,将疏水性氨基酸切除而达到脱苦目的的方法。酶法脱苦效率高,而且条件温和,不会使蛋白多肽的营养成分丢失,水解过程易于控制,同时不改变蛋白多肽的各种重要特性(如溶解性、抵抗原性)等优点。

蛋白酶按其水解蛋白质的方式可分为内肽酶和外肽酶。内肽酶作用于蛋白质分子内部肽键,生成小分子肽段,脱苦作用较差。外肽酶作用于蛋白质或多肽分子氨基或羧基末端的肽键,水解掉肽端疏水氨基酸,因此脱苦效果相对较好。目前食品加工所用的蛋白酶绝大部分为胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶等的内切型蛋白酶,而可用于脱苦用的外切型蛋白酶几乎没有,因此有必要大力开发外切型蛋白酶。外肽酶包括羧肽酶和氨肽酶两种。

1. 氨肽酶法 氨肽酶通过作用于肽链的氨基端疏水氨基酸并将其水解下来,从而达到去除

苦味的目的。目前研究应用最多的是微生物产生的氨肽酶。1973年 Clegg 等发现猪胰均质物能降低酪蛋白水解物的苦味,经确证猪胰中存在一种能降解苦肽的氨基多肽酶 P (aminopeptidase P),随后有很多文献报道了不同来源的氨肽酶脱除苦肽的方法。

Etsua, Minagwa 等用氨肽酶 T 处理由枯草杆菌蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶分别酶解得到的蛋白水解物,发现氨肽酶 T 有广泛的作用底物,尤其是水解多肽或蛋白质的 N-端疏水氨基酸。研究表明,用枯草杆菌蛋白酶水解酪蛋白 2h 以后,再用氨肽酶 T 处理 30min,苦味减轻,进一步水解则苦味完全消失,水解得到的氨基酸主要是 Ala、Val、Met、Ile、Leu 和 Phe 等疏水氨基酸。当用氨肽酶处理木瓜蛋白酶水解物时,得到的自由氨基酸主要是 Ser、Ala、Val、Met、Leu、Tyr 和 Phe,处理 20h 后仍有少许苦味,作用效果不如前者好。分析可能是木瓜蛋白酶水解物中含有大量氨肽酶 T 不能水解的苦味肽,或者是氨肽酶 T 处理后的产物不能掩盖其中苦味肽的苦味。另外,氨肽酶 T 不能释放任何苦味肽中的 Asp 和 Pro,也很难释放 Glu,而这两种氨基酸在苦味肽中的含量却很丰富。

Lzawa 等研究了氨肽酶对大豆蛋白质的胃蛋白酶水解物的脱苦效果,处理反应 21h 后苦味完全消失,经比较证实,该酶对大豆蛋白水解物的脱苦效果明显好于酪蛋白水解物。

2. 羧肽酶 羧肽酶作用于肽链羧基端的疏水氨基酸并使其释放出来,从而达到脱苦的目的。由于大部分苦味肽中的疏水性氨基酸位于 C-端,所以近年来有关羧肽酶的研究受到国内外的普遍关注。羧肽酶广泛地存在于动物和高等植物及微生物中,现在已知的产羧肽酶微生物有:曲霉属、青霉属、单胞杆菌属及酵母中的一些菌株。

(1) 小麦羧肽酶。Umetsu 等采用小麦来源的羧肽酶用于酪蛋白水解物的苦味脱除,发现随着游离氨基酸的增加,其苦味不断下降,释出的氨基酸绝大部分为疏水性氨基酸,这种酶可以从蛋白或肽链的羧基端大范围内释放出包括脯氨酸在内的氨基酸残基,同时不含有微生物毒素,安全性较高。Q 值大于 1 400 的较苦的多肽容易酶解形成二肽片段,其中丰富的谷氨酸还能起掩盖苦味的作用。

(2) 微生物羧肽酶。羧肽酶主要存在于猪和牛等的胰脏中,由于动物来源的羧肽酶非常有限,使其应用受到限制。1970 年 Arzi 等证实了用曲霉羧肽酶处理大豆蛋白水解物,可以降低其水解产物的苦味。

研究表明,许多种微生物都能产生羧肽酶,如曲霉属的黑曲霉和米曲霉,硫代叶菌属和水生栖热菌可产生耐热羧肽酶,肉色拟青霉、酵母可产生丝氨酸羧肽酶。其中黑曲霉和米曲霉因其使用安全而在食品中得到广泛的应用。

微生物羧肽酶大多是丝氨酸羧肽酶,多是在酸性条件下从多肽和蛋白的羧基端释放包括脯氨酸在内的大多数疏水氨基酸残基,水解速度受占据羧基末端末位的氨基酸残基的影响。丝氨酸羧肽酶广泛分布于真菌及高等动植物中,丝状真菌的含量尤其丰富,这些酶特异地从肽和蛋白的羧基端释放氨基酸。它们水解多肽时切除羧基端氨基酸,在转肽酶反应时能够取代羧基端氨基酸而不破坏肽链的内部结构,所以羧肽酶在肽的合成和碳端测序的研究中受到人们的关注。

荒木秀雄等采用稻属曲霉菌株 ES1-32 产生的含有脯氨酰肽链内切酶和羧肽酶的混合制剂对大豆、花生、小麦和酪蛋白等进行了实验,并证明此类酶去除苦味的效果比较理想。钱方等应用复合风味酶(内肽酶和外肽酶的复合物)水解大豆多肽,结果基本不产生苦味。

主要参考文献

- [1] 袁勤生编著. 应用酶学. 上海: 华东理工大学出版社, 1994
- [2] 熊振平编著. 酶工程. 北京: 化学工业出版社, 1989
- [3] 毛忠贵主编. 生物工业下游技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- [4] 宋思扬编著. 生物技术概论. 北京: 科学出版社, 2000
- [5] 彭志英主编. 食品生物技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- [6] 王岁楼主编. 食品生物技术. 北京: 海洋出版社, 1999
- [7] 怀特曼 A. 著. 徐家立等译. 酶生物技术手册. 北京: 科学出版社, 1989
- [8] 郭勇主编. 酶工程. 北京: 中国轻工出版社, 1994
- [9] 俞俊堂, 唐孝宣主编. 生物工艺学 (上册). 上海: 华东化工学院出版社, 1991
- [10] 《微生物工程》编写组. 微生物工程. 上海科学技术出版社, 1982
- [11] 姜锡瑞主编. 酶制剂应用技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1997
- [12] Wood J. (ed). Immobilized Cells and Enzymes. IRL Press, Oxford, 1985
- [13] 相尺孝亮等著. 黄文涛等译. 上海: 上海科学出版社, 1989
- [14] G.A. Tucker L.F.J. Woods 著. 李雁群, 肖功年译. 酶在食品加工中的应用. 北京: 中国轻工业出版社, 2001
- [15] Yongn, Lee. Fundamentals of Food Biotechnology. VCH Publishers Inc. 1996
- [16] 高焕春. 乳糖酶的特性及其在乳品工业中的应用. 中国乳品工业. 1996, 24 (3): 19~21
- [17] 秦燕, 宁正祥等. β -半乳糖苷酶的应用研究进展. 2000, 31 (6): 595~599
- [18] 杨宝进. 对不同凝乳酶制作羊奶干酪效果的研究. 1998, 13 (2): 105~108
- [19] 张红城, 彭志英等. 转谷氨酰胺酶在食品中的应用. 食品与发酵工业. 1998, 24 (3): 73~74
- [20] 叶丹英, 彭志英. 转谷氨酰胺酶及其在食品加工中的应用. 郑州粮食学院学报. 2000, 21 (2): 46~49
- [21] 张学兵, 岳振峰等. 转谷氨酰胺酶的功能特性及其在乳品中的应用. 中国乳品工业. 2000, 28 (6): 42~46
- [22] 罗仓学, 陈雪峰等. 壳聚糖和果胶酶对苹果汁澄清效果的比较研究. 西北轻工业学报. 1999, 14 (4): 19~23
- [23] 邱临雁, 王金华. 果胶酶对山楂酒澄清的研究. 湖北农业科学. 1996 (6): 67~70
- [24] 段旭昌, 杨荣慧. 果胶酶在黑加仑果汁加工中的应用技术研究. 1999 (1): 1~6
- [25] 刘延琳. 超滤及果胶酶处理生产澄清型葡萄汁. 西北农业大学学报. 1998, 26 (1): 104~107
- [26] 李文德, 张礼星. 纤维素酶提取甜菜果胶的工艺条件. 1999, 18 (4): 42~45
- [27] 万日余, 顾岱芳等. 纤维素酶在草莓汁生产中的应用. 冷饮与速冻食品工业. 1996 (4): 84~85
- [28] 刘同军, 张玉臻. 半纤维素酶的应用进展. 食品与工业发酵. 1998, 24 (6): 58~60
- [29] 宋国安. 纤维素酶的应用开发前景. 河南化工. 1999 (6): 5~6
- [30] 丁海标, 张声华. 葡萄糖氧化酶等抗氧化剂保护橙汁中 L-抗坏血酸的研究. 食品科学, 1995, 16 (4): 14~16
- [31] 马美湖, 唐晓峰. 氯化钙和木瓜蛋白酶对牛肉嫩化效果的研究. 湖南农业大学学报. 2001, 27 (1): 63~66
- [32] 宋欣, 范宗忠. 微生物脂肪酶在食品工业中的应用. 中国畜产与食品. 1998, 5 (3): 137~138

- [33] 吴苏喜. 中国油脂脂肪酶在食用油脂工业上的应用. 中国油脂. 1999, 24 (3): 34~36
- [34] Fran K.D. Gunstone Enzymes as Biocatalysts in the Modification of Natural Lipid. Journal of the science of Food and Agriculture. 1997, 79: 1 535~1 549
- [35] Deguan Zhou and Xuebing Xu. Enzymatic Enrichment of Long Chain PUFA from Fish Oil. 食品科学. 2000 Vol. 21. No. 12
- [36] Xuebing Xu. Enzymatic Production of Structured Lipids. 食品科学. 2000 Vol. 21. No. 12
- [37] Stephen R. Moore and Gerid P. McNeill. Production of Triglycerides Enrichment in Long Chain n-3 PUFA from Fish Oil. JAOCS, 1996 Vol. 73. No. 11
- [38] Gerald P. McNeill et al. Lipase-catalyzed Enrichment of Long-Chain PUFA. JAOCS, 1996 Vol. 73. No. 11
- [39] Y. Y. Linko et al. Lipase Biocatalysis in the Production of Esters. JAOCS, 1995 Vol. 72. No. 11
- [40] Ki-Teak Lee and Casimir C. Akoh. Solvent-Free Enzymatic Synthesis of Structured Lipids from Peanut Oil and Caprylic Acid in a Stirred Tank Batch Reactor. JAOCS, 1998 Vol. 75. No. 11
- [41] G. P. McNeill and P. E. Sonnet. Low-calorie Triglyceride Synthesis by Lipase-catalyzed Esterification of monoglycerides. JAOCS, 1995 Vol. 72. No. 11
- [42] 黄惠芝, 马林. 葡萄糖氧化酶在啤酒生产中的应用研究. 食品科学. 1998, 19 (11): 21~24
- [43] 郭少春, 刘凯等. 酒精专用淀粉酶的应用研讨. 酿酒. 1996 (6): 41~42
- [44] 马家军, 屈庆民. 酸性蛋白酶在浓香型酒发酵中的应用研究. 酿酒科技. 2000 (2): 32~33
- [45] 尚维, 杨福祺等. 纤维素酶在清香型优质白酒中应用初探. 1996 (2): 20~21
- [46] 汪钊, 郑裕国等. 真菌 α -淀粉酶应用于面包生产的研究. 食品科学, 1998, 19 (7): 29~31
- [47] 施永泰, 朱睦元. 大麦淀粉酶的研究和展望. 大麦科学. 2001 (1): 5~8
- [48] 夏萍, 金茂国等. 葡萄糖氧化酶在面包中的应用研究. 食品工业. 1999 (6): 23~24
- [49] 林家永, 封雯瑞. 葡萄糖氧化酶与脂肪酶改善面粉质量的作用. 粮油食品. 1996 (7): 3~4
- [50] 陈立功, 许艳杰, 许方敏. 阿斯巴甜合成工艺研究. 化学通报, 2001 (7): 428~431
- [51] 冯海峰, 钟洁, 刘国琴. 阿斯巴甜结构式阿斯巴甜合成的研究. 郑州粮食学院学报. 1998 (6): 14~23
- [52] 陈立功, 许艳杰, 许方敏. 阿斯巴甜合成工艺研究. 化学通报. 2001 (7): 428~431
- [53] 周力. 阿斯巴甜的生产与应用. 食品科学. 1997, 18 (7): 18~21
- [54] 钱浩, 胡巧铃. 甜味剂三氯蔗糖的合成. 中国医药工业杂志. 1997, 28 (7): 296~297
- [55] 周力. 三氯蔗糖的生产与应用. 食品科学. 1997, 18 (8): 38~41
- [56] 黄素梅, 黎四芳, 张海广等. 甜味剂三氯蔗糖的合成工艺与应用研究进展. 化工进展, 2000 (4): 56~61
- [57] 邵丽文. 食品防腐剂月桂酸单甘酯的合成. 广州食品工业科技, 1994 (1): 44~46
- [58] 彭立凤, 刘新喜, 杨国营. CaCO_3 粉末作载体固定化脂肪酶催化合成单甘酯. 日用化学工业, 2001 (10): 13~15
- [59] 高修功, 章克昌, 曹淑桂. 温度对单甘酯的合成起关键作用. 无锡轻工大学学报, 2000, 16 (3): 47~50
- [60] 彭立凤, 谭天伟. 反胶团体系脂肪酶催化棕榈油水解合成单甘酯. 中国油脂. 1999, 24 (4): 32~35
- [61] 夏咏梅, 章克昌. 表面活性剂铜绿假单胞菌脂肪酶无溶剂催化棕榈油甘油解. 精细化工. 2000, 17 (4): 198~201
- [62] 吴可克, 陈丽凤, 宋文静等. 酶促玉米油甘油解制备双、单甘酯. 中国油脂. 2000, 25 (1): 55~57
- [63] 刘新喜, 彭立凤. 固定化脂肪酶催化合成单甘酯. 中国油脂. 2001, 26 (1): 40~43
- [64] 夏咏梅, 章克昌. 无溶剂体系中脂肪酶催化合成单甘酯的研究. 化学通报. 2001 (5): 303~305
- [65] 倪永全, 杜志云, 黄旭东等. 不饱和酸单甘酯的研制. 无锡轻工大学学报. 1995, 14 (2): 143~148
- [66] 倪永全, 杜志云. 缩水甘油的制备及单甘酯的合成. 石油化工. 1996, 25 (8): 535~539
- [67] 彭立凤, 谭天伟. 脂肪酶催化牛油甘油解反应合成单甘酯. 河北师范大学学报. 1998, 22 (2): 219~222
- [68] 彭立凤, 谭天伟. 有机相脂肪酶催化合成单甘酯的研究进展. 化学世界. 1998 (3): 119~126

- [69] 黄显慈编译. 用生物技术合成纯单甘酯. 广州食品工业科技. 1994 (2): 51~52
- [70] 朱伯儒, 史作清, 何炳林. 环糊精葡萄糖基转移酶的性质、应用与固定化研究进展. 氨基酸与生物资源. 1997, 19 (1): 36~39
- [71] 张心平, 张蓓, 李翠玲. 环状糊精葡萄糖基转移酶的性质及环糊精的转化条件. 南开大学学报. 1994 (4): 63~67
- [72] 李里特, 孙艳. 生淀粉生产环糊精的研究. 食品与发酵工业. 2000, 26 (4): 21~24
- [73] 田晖, 谢伯泰, 孙连魁等. 环状糊精葡萄糖基转移酶在壳聚糖上的固定化. 西北大学学报. 25 (3): 223~226
- [74] 朱伯儒, 史作清, 何炳林. 环糊精葡萄糖基转移酶的固定化及其应用. 应用化学. 1996, 13 (6): 28~30
- [75] 赵玉红, 孔包华. 鱼蛋白水解研究进展. 肉类工业. 2000 (3): 31
- [76] 曹劲松, 王晓琴, 彭志英. 微生物酶法合成低聚糖的问题与策略. 食品与发酵工业. 1999, 25 (4): 41~47
- [77] 蒋世琼, 马丽, 杨海. 功能性低聚糖的制造与生物技术研究探讨. 食品工业科技. 20 (3): 64~65
- [78] 周中凯, 王洪岩. 粮油深加工及食品异麦芽低聚糖生产新工艺的研究. 粮食与饲料工业. 1997 (12): 30~32
- [79] 耿子欢, 张本山, 于淑娟. 异麦芽低聚糖的生产及生理功能. 食品工业. 1997 (3): 3~4
- [80] 李志达, 陈俭锋, 张蓉真等. 双酶协同作用酶解淀粉制取麦芽低聚糖的工艺研究. 中国粮油学报. 1994, 9 (4): 48~54
- [81] 李昊, 李志达, 魏建敏. 中空纤维酶膜反应器制取麦芽低聚糖的工艺研究. 中国粮油学报. 1998, 13 (5): 49~52
- [82] 张齐军, 覃兰芳. 木薯淀粉生产异麦芽低聚糖粉的工艺研究. 食品科学. 2000, 21 (10): 26~28
- [83] 杨连生, 扶雄, 何小维等. 以 α -葡萄糖苷酶为主酶制备异麦芽低聚糖. 食品科学. 1999 (2): 20~22
- [84] 董英敏. 壳低聚糖的合成及其应用. 化工进展. 1994 (1): 42~46
- [85] 邹毅, 杨海, 蒋世琼. 蔗果低聚糖的功能生产及研究进展. 广西大学学报. 1997 (3): 85~90
- [86] 唐军, 储炬, 李友荣. 微生物酶法生产果糖低聚糖. 华东理工大学学报. 1999, 25 (4): 373~381
- [87] 马丽, 杨海, 蒋世琼. 固定化酶法合成蔗果低聚糖的研究. 食品与发酵工业. 1995 (4): 12~16
- [88] 洪枫, 陈牧, 余世袁. 酶的选择性纯化及酶解制备木低聚糖的研究. 林产化学与工业. 1999, 19 (6): 49~54
- [89] 周中凯, 程觉民. 酶促水解蔗糖生产果葡糖浆新工艺. 甘蔗. 1997, 4 (2): 19~22
- [90] 金其荣, 王晓晴. α -葡萄糖苷酶的初步研究及其在异麦芽低聚糖浆生产中的应用. 食品科学. 1995, 16 (4): 20~24
- [91] 刘佐才, 侯平然. 酶法生产果葡糖浆的发展. 冷饮与速冻食品工业. 2001, 7 (3): 39~41
- [92] 宋启龙. 营养型甜味剂——果葡糖浆的生产工艺及其应用. 陕西粮油科技. 1995, 20 (3): 20~25
- [93] 周中凯, 杨春枝. 蔗糖酶生产菌选育及其在果葡糖浆生产中的应用. 甘蔗糖业. 1998 (1): 32~35
- [94] 刘爱民, 刘培忠, 刘友良. 以大米为原料生产果葡糖浆探讨. 粮食科技与经济. 1999 (1): 27~28
- [95] 张蓉真, 李珑, 李建才. 大豆水解蛋白对乳酸菌增殖的促进作用. 中国粮油学报. 1997, 12 (6): 40~43
- [96] 葛文光. 大豆多肽的生理功能及作用. 无锡轻工大学学报. 1996, 15 (3): 272~277
- [97] 李书国. 大豆多肽食品的开发. 食品科学. 1997, 18 (9): 13~15
- [98] 黄鹂红. 大豆多肽的生理功能及应用 (一). 食品科技. 1999 (3): 50~51
- [99] 黄鹂红. 大豆多肽的生理功能及应用 (二). 食品科技. 1999 (4): 51~52
- [100] 邓勇, 吴熠欢. 大豆多肽研究与开发: 线装、问题、建议. 中国农业大学学报. 1999, 4 (4): 89~83
- [101] 李书国, 陈辉, 杜进民等. 粮油大豆多肽的功能特性及加工工艺. 食品科技. 2000 (1): 13~14
- [102] 张玲华, 唐小俊, 张宝玲等. 大豆多肽制备工艺的研究. 食品与发酵工业. 2000, 27 (3): 37~39

- [103] 邓勇, 冯学武. 大豆多肽分子质量分布与苦味的确定. 中国农业大学学报. 2001, 6 (4): 98~102
- [104] 张延坤, 刘炳智. 植物蛋白水解物苦味的产生及其去除方法. 天津农业科学. 1997, 3 (4): 39~43
- [105] 汪秋安. 蛋白水解物的生产与应用. 食品工业科技. 1999, 20 (4): 66~67
- [106] 邓勇, 吴熠欢. 微生物蛋白酶对大豆分离蛋白水解作用的研究. 食品科学. 1999 (6): 42~45
- [107] 钱方, 邓岩, 王凤翼等. 蛋白酶及其大豆蛋白水解物苦味的研究. 大连轻工业学院学报. 2000, 19 (3): 182~186
- [108] 唐传核, 彭志英. 大豆蛋白水解物的苦肽以及脱除方法进展. 中国油脂. 2000, 25 (6): 167~172
- [109] 李理, 罗泽民等. 梨型毛霉蛋白酶在大豆多肽制备中的应用. 中国粮油学报. 2001, 16 (1): 56~57
- [110] 玉红, 孔保华, 张立钢等. 鱼蛋白水解物功能特性的研究. 东北农业大学学报. 2001, 32 (2): 175~180
- [111] 唐传核, 彭志英. 乳蛋白水解物中苦肽的研究. 中国乳品工业. 2001, 29 (1): 8~12
- [112] 郑华傅, 伟龙, 林捷. 牛乳酪蛋白水解物的特性分析. 华南农业大学学报. 2001, 22 (4): 84~87
- [113] 王长云, 林洪, 周东等. 从鳕鱼碎肉中提取水解蛋白. 海洋湖沼通报. 1995 (4): 33~36
- [114] 吴新良, 罗慧, 黄羨明. 动物水解蛋白及其应用. 食品科学. 2000, 21 (22): 32~34
- [115] Removing Bitterness from Protein Hydrolysates. Food Technology, 1994 (10)
- [116] Brinton C.S. et. al. J. Am. Chem. Soc. 1927, 49: 38~40
- [117] Sakai T. et. al. Agric. Biol. Chem. 1978, 42: 2427~2429
- [118] Sakai T. et. al. Adv. App. Microbiol. 1993, 39: 213~294
- [119] Sakai T. et. al. Agri. Biol. Chem. 1984, 48: 1951~1961
- [120] Sakai T. et. al. Agri. Biol. Chem. 1984, 48: 1941~1950
- [121] Sakai T. et. al. Agri. Biol. Chem. 1982, 46: 667~676
- [122] Hours R.A. et. al. Biotechnol. Lett. 1994, 16: 721~726
- [123] Sakamoto T. et. al. Biosci. Biotech. Biochem. 1994, 58: 353~358
- [124] Sakai T. et. al. Agric. Biol. Chem. 1990, 54: 879~889
- [125] Sakamoto M. et. al. Eur. J. Biochem. 1994, 226: 285~291
- [126] Furutani S. et. al. Sci. Bull. Fac. Agric. Kyushu Univ. 1965, 22: 35~43
- [127] Sakai T. et. al. Agric. Biol. Chem. 1985, 49: 449~458
- [128] Iguchi K. et. al. Biosci. Biotech. Biochem. 1996, 60: 603~607
- [129] Iguchi K. et. al. Microbiology. 1997, 143: 1 657~1 664
- [130] Sakamoto T. et. al. Eur. J. Biochem. 1997, 245: 708~714
- [131] Sakamoto T. et. al. FEBS Letters. 1996, 398: 269~273
- [132] Yoshikawa M. et. al. Applied Biological Science. 1995, 1: 71~82
- [133] Sakai T. et. al. Mem. Fac. Agr. Kinki Univ. 1999, 32: 1~19
- [134] Sakai T. et. al. Appl. Environ. Microbiol. 1980, 39: 908~912
- [135] Nakamura T. et. al. J. Food Sci. 1995, 60: 468~472
- [136] Kawabata K. et. al. Japanese Journal of Nutrition. 1995, 53 (3): 183~190
- [137] Mitsui T. et. al. Plant Tissue Cult. Lett. 1990, 7: 14~18
- [138] Sakai T. et. al. J. Pat. 6~220772 (1994)
- [139] Sakai T. et. al. J. Textile Machin. Soc. Jap. 1992, 45: 19~32
- [140] Sakai T. Dyeing and Finishing. 1996, 14: 1~7
- [141] Sakai T. Dyeing Industry. 1995, 43: 2~13
- [142] Sakai T. Bioscience & Bioindustry. 1996, 54: 26~31
- [143] 尤华, 陆兆新等. 微生物原果胶酶研究进展. 工业微生物, 2000
- [144] Jiang S-T et. al. Microbial Transglutaminase Effects Gel Properties of Golden Threadfin and Pollack Surimi. Journal of

Food Science.2000 , 65 (4) : 694~699

- [145] Faergemand Merete , Murry Brent . Interfacial Dilatational Properties of Milk Proteins Cross-linked by Transglutaminase . Journal of Agricultural and Food Chemistry . 1998 , 46 (3) , 884~890
- [146] 王森 , 吴小平 . 转谷氨酰胺酶在肉制品中的应用 . 食品机械 . 2001 (3)
- [147] 廖祥儒 , 朱新 . 产植物转谷氨酰胺酶 . 生命的化学 . 1996 , 16 (5) : 31~33
- [148] 杨小泉 , 陈中等 . 转谷氨酰胺酶催化大豆蛋白和乳清蛋白合成耐热性聚合蛋白 . 中国粮油学报 . 2001 , 16 (2) : 22~25
- [149] 陈义华 . 转谷氨酰胺产酶菌种的选育、发酵条件优化及酶学性质研究 . 硕士学位论文 (酶) . 2000
- [150] 马茂荣 , 王伟理 . α -乙酰乳酸脱羧酶在啤酒酿造中的作用 . 浙江工业大学学报 . 1996 , 24 (1) : 77~81
- [151] 杨小东 , 孙文斌等 . 国产 α -乙酰乳酸脱羧酶的应用研究 . 酿酒 . 2001 , 28 (1) : 404~405
- [152] 尹东 , 曾庆华等 . 二种重组 α -乙酰乳酸脱羧酶在啤酒生产中降低双乙酰的作用 . 微生物学通报 . 1999 , 26 (6) : 405~407
- [153] 刘秀强 . α -乙酰乳酸脱羧酶在啤酒中的应用 . 广州食品工业科技 . 1994 , 14 (4) : 51~52
- [154] 黄秀鸾 . 啤酒老熟剂—— α -乙酰乳酸脱羧酶运用与啤酒发酵及其添加量探讨 . 广州食品工业科技 . 1994 (3) : 32~35
- [155] 陈炜 , 何秉旺 . α -乙酰乳酸脱羧酶的研究 . 微生物学报 . 1994 , 21 (2) : 82~85
- [156] 张润博 , 刁爱坡等 . α -乙酰乳酸脱羧酶的研究进展及其应用前景 . 微生物学报 . 1997 , 24 (4) : 241~243
- [157] 李林 , 帕尔哈提 . α -乙酰乳酸脱羧酶应用研究 . 新疆工学院学报 . 1995 , 16 (3) : 225~228
- [158] Georgios Lalasidia and Lars-Borje Sjoberg . Two New Methods of Debittering Protein Hydrolysates and a Fraction of Hydrolysates with Exceptionally High Content of Essential Amino Acids . J. Agric. Food Chem. 1978 , 26 (3)
- [159] Section and Overproduction of Carboxypeptidase Y by a *Saccharomyces cerevisiae*.ss II Mutant Strain , Biosci. Biotech , Biochem. 1993 , 57 (10) : 1 686~1 690
- [160] Hiroatsu Matsuoka , et al. Purification and Debittering Effect of Aminopeptidase II from *Penicillium caseicolum* , J. Agric. Food Chem. 1991 (39) : 1 392~1 395
- [161] Hironori Umetsu , Hiroatsu Matsuoka and Eiji Ichishima. Debitter Peptides from Milk Casein by Wheat Carboxypeptidase , J Agric. Food Chem. 1983 (31) : 50~53
- [162] Kiyishi Hayashi et al. Purification and Characterization of Two Aminopeptidases Produced by *Brevibacterium* Lines , Journal of General Microbiology. 1989 (135) : 2 027~2 034
- [163] Noboru Izawa et al. Debittering of Protein Hydrolysates Using *Aeromonas caviae* Aminopeptidase , Journal of Agricultural and Food Chem.

细胞工程原理及其在食品工业中的应用

细胞工程是生物工程中的一个重要组成部分,随着其理论和应用的不断发展,已经广泛渗入到食品工业中来。食品工程中,利用各种微生物发酵生产蛋白质、酶制剂、氨基酸、维生素、多糖以及食品添加剂等产品,为了得到高产优质的菌种,除了其他方法外,细胞融合技术是非常有效的手段,并具有独特的优点;利用动植物细胞培养技术可以生产保健食品的重要成分以及特种食品香味和风味添加剂;而在动植物的育种和植物、家畜品种的改良中,细胞工程更是发挥了巨大的作用。

一般认为,细胞工程(cell engineering)主要包括细胞融合、细胞拆分(核移植、细胞器移植)、大规模细胞培养工程、繁殖生物学技术(胚胎培养、胚胎移植)、染色体和染色体组工程等。

第一节 细胞工程原理

一、细胞工程概述

随着细胞生物学和分子生物学突飞猛进的发展,20世纪80年代初期出现了细胞工程这一新概念。它是生物技术的重要组成部分,是细胞水平上的生物工程。

细胞工程是应用细胞生物学和分子生物学的理论和方法,按照人们的设计蓝图,在细胞水平上进行遗传操作及进行大规模的细胞和组织培养,在细胞水平上的遗传操作,即通过细胞融合、核质移植、染色体或基因移植以及组织和细胞培养等方法,快速繁殖和培养出人们所需要的新物种的技术。它的优势在于避免了分离、提纯、剪切、拼接等基因操作,只需将细胞遗传物质直接转移到受体细胞中就能够形成杂交细胞,因而能够提高基因的转移效率。此外,不仅可以在植物与植物之间、动物与动物之间、微生物与微生物之间进行杂交,甚至可以在动物与植物、微生物之间进行融合,形成前所未有的杂交物种。根据设计要求,按照需要改造的遗传物质的不同操作层次,可将细胞工程分为细胞融合、细胞拆分(核移植、细胞器移植)、大规模细胞培养工程、繁殖生物学技术(胚胎培养、胚胎移植)和染色体工程等。

(一) 细胞融合

细胞融合是利用自然或人工的方法使两个或几个不同细胞融合为一个细胞,用于制造新的物种或品系(植物、微生物上用得多,动物上用得少)及产生单克隆抗体等。其中单克隆抗体技术利用克隆化的杂交瘤细胞分泌高度纯一的单克隆抗体,具有很高的实用价值,在诊断和治疗病症方面有着广泛的应用前途。

(二) 细胞拆分

细胞拆分又称细胞质工程,是通过物理或化学方法将细胞质与细胞核分开,再进行不同细胞

间核质的重新组合，重建成新细胞，也包括各种细胞器的分离和重新组合，可用于研究细胞核与细胞质的关系的基础研究和育种工作。

(三) 大规模细胞培养工程

大规模的细胞培养可分为 3 个层次：单个细胞培养、组织培养和器官培养。植物细胞和原生质体培养技术可以用于育种，也可用于各类植物的快速繁殖，在培养无毒苗、长期贮存种子和生产次生代谢产物等方面发挥了重要作用。动物细胞培养技术可用于制取许多有应用价值的细胞产品，如疫苗和生长因子等。利用细胞培养系统可进行毒品和药物检测；一些培养细胞可用于疾病治疗。

(四) 繁殖生物学技术

繁殖生物学技术主要包括体外受精技术、胚胎移植技术、家畜性别决定、克隆动物等。

(五) 染色体工程

染色体工程是按照人们的需要来添加或削减一种生物的染色体，或用别的生物的染色体来替换。染色体工程可分为动物染色体工程和植物染色体工程两种。动物染色体工程主要采用对细胞进行微操作的方法（如微细胞转移方法等）来达到转移基因的目的；植物染色体工程目前主要是利用传统的杂交回交等方法来达到添加、消除或置换染色体的目的。

染色体组工程是整个改变染色体组数的技术。自从 1937 年秋水仙素用于生物学后，多倍体的工作得到了迅速发展，例如得到四倍体小麦、八倍体小黑麦等。

细胞工程的应用是多方面的，以植物全能性为基础的植物组织和细胞的培养技术已经获得各种试管植物数千种，运用花药培养技术已得到多种优良品种；无病毒植物的生产，花卉苗木的快速大量繁殖已收到明显效益；运用细胞大量培养技术可以获得有重要经济价值的药物和其他产品；细胞器移植、体外受精、胚胎培养为植物和家畜品种的改良提供了新的途径；细胞融合技术可以以其独特的优点对微生物进行改造，并有可能获得前所未有的生物为人类造福；而由杂交瘤细胞生产的单克隆抗体则可被称为“生物导弹”，它将在征服危及人类生命的恶魔——癌症的过程中发挥重大作用。

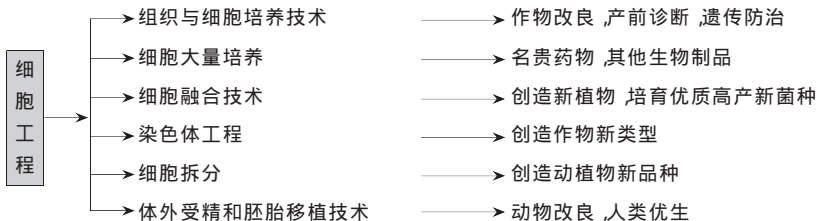


图 5-1 细胞工程的主要技术及其应用

二、细胞工程的主要技术领域

近年来，细胞工程中涉及的技术越来越广，新的技术也在不断涌现，现在简述应用较多的几项主要技术。

(一) 细胞融合技术

细胞融合 (cell fusion), 又称体细胞杂交 (somatic hybridization), 这种生物学现象最初是在动物细胞中发现的。20 世纪 50 年代, 日本学者把经紫外线灭活的仙台病毒 (HVJ) 混在两种不同的动物细胞中。结果发现, 细胞之间发生凝集, 异种细胞彼此融合成一体, 在一些细胞中存在两个以上的细胞核。随着原生质体制备技术的发展, 到了 60 年代, 细胞融合技术很快发展了起来。1970 年, Ruddle 等对细胞融合技术开展了系统的研究。在促进细胞融合的方法上, 高国楠 (1974) 发现聚乙二醇 (PEG) 在 Ca^{2+} 参与的情况下, 可以有效地提高原生质体融合的效率。到了 80 年代, 除了生物方法和化学方法外, 还发展了高效的电融合法, 并出现了激光融合法等新技术。现在已经证明, 细胞融合可以在种间、属间、科间甚至动物与植物间发生, 其范围包括微生物、植物和动物, 而且人细胞与植物细胞之间的融合也成为可能。

细胞融合具有巨大的理论意义和应用价值。它不仅在基础研究 (如核质相互关系、基因的作用和定位、肿瘤发生等) 方面有重要作用, 而且在动植物的改良、微生物育种以及基因治疗和疾病诊治等方面有着美好的前景, 它已经成为细胞工程中的核心技术。

1. 细胞融合的机理 现代细胞生物学的研究表明, 细胞的生物膜是一种脂双层结构, 蛋白质分子镶嵌在膜中, 这种结构的最大特点是具有流动性, 这一点非常适合于细胞之间的融合。要实现不同细胞的融合, 首先要求膜之间彼此靠近, 克服二者之间的静电斥力和水合力; 然后两层膜连接起来, 局部的双层构象破坏, 形成不稳定的中间结构, 两个细胞的胞内物质互相接触, 遗传物质发生交换重组; 最后融合完成, 新的双层构象重新形成。

目前比较公认的看法是: 在膜融合过程中, 磷脂采取六角形 II 相或反微团构象, 在该构象中, 磷脂排列成六角形管状结构, 极性头部向中心形成直径 2nm 的水相孔道。细胞融合受很多的因素影响, 脂的组成是影响融合的内在因素。在单一磷脂体系中, 由完全饱和脂肪酸组成的脂, 在一般的生物环境中, 都采取双层构象, 不形成磷脂六角形 II 相, 而不饱和程度越高则越容易形成这种构象, 越利于细胞融合的发生。当然, 不饱和脂肪酸的比例越高, 细胞的流动性也越好。另外, 温度、二价阳离子、pH、蛋白和多肽等外界因素均会影响到膜的融合。温度升高会使含有非双层脂的脂双层转变成为非双层结构, 而不利于融合的发生。pH 影响的最典型的是对磷脂酰乙醇胺 (PE) 产生的影响, pH > 8~9 才能形成双层, pH < 7 则形成非双层。二价阳离子 Ca^{2+} 容易诱发含心磷脂、磷脂酰丝氨酸等带负电的脂双层结构不稳定, 形成磷脂六角形 II 相, 同时 Ca^{2+} 离子也中和了这些脂的静电荷, 使得膜间的静电斥力减弱, 水化作用也同时减弱, 这也是运用聚乙二醇进行诱导融合时, 同时与 Ca^{2+} 离子结合使用的原因。一些可以插入膜双层的肽 (如蜂肽、心毒素等), 由于具有较长的疏水片段, 促进磷脂六角形 II 相的形成; 而具有较长亲水片段的肽或蛋白质的作用恰恰相反, 比如血型糖蛋白, 水化后起到稳定脂双层的作用, 不利于融合的发生。

2. 细胞融合的一般过程 微生物、动物、植物细胞融合的具体方法都不一样, 这里介绍一般的步骤, 具体的过程见后面的几节内容。

细胞融合的第一步是原生质体的制备和再生。原生质体即是指用酶法或物理的方法使细胞壁溶解, 释放出的只具有半透膜的细胞, 动物细胞没有细胞壁, 只要用合适的方法制备成符合要求的悬液就可以了; 植物和微生物的细胞有细胞壁, 首先要脱壁, 不同的细胞脱壁的方法有很大不

同，要根据具体的操作对象来决定，可以参考后面的内容。

第二步，诱导细胞使之发生融合。在细胞融合前要挑选有活力的原生质体，将两亲株的原生质体混合在一起，采用生物学或化学、物理的方法，促使亲本细胞的融合。

第三步，筛选杂种细胞。融合处理后，原生质体在培养基中再生出细胞壁（动物细胞不需要），进行繁殖，产生由亲本细胞、同源融合细胞及杂种细胞组成的混合体。要有效地从其中筛选出杂种细胞，要求亲本细胞要有一定的遗传标记，对于微生物细胞，常用的是营养缺陷型和抗药性标记；对于动物细胞，采用 Littlefield 在 1964 年发现的 HAT（H 代表次黄嘌呤，A 代表氨基嘌呤，T 代表胸腺嘧啶脱氧核苷）培养基是非常有效的手段；植物中可以利用叶绿素缺失互补、营养缺陷互补、抗性互补、利用生长特性等方法。总之，在选择性培养基上，只有同时具有了两个亲本标记特性的融合子才能生长出来，从而达到筛选的目的。

第四步，杂种细胞的培养（植物中称为杂种细胞的分化）。对于动物细胞，要在一定的条件下，按一定的方法培养，使杂种细胞能够继续繁殖；微生物和植物细胞要使原生质体再生成完整的细胞，即长出细胞壁，并成为无性繁殖系，达到预期的育种目的。

3. 诱导细胞融合的主要方法 现在已经建立了多种细胞融合技术。早期的原生质体融合实验，曾采用离心力的作用使两种不同的原生质体紧密地挤在一起以帮助融合，或者在冷的渗透稳定剂中使原生质体密集凝聚，但效果都不太好。20 世纪 60 年代初，病毒诱导细胞融合技术的出现，开创了人工诱导细胞融合的新领域，70 年代后逐渐开始广泛使用化学融合剂，并成为人工诱导细胞融合的主要手段；80 年代初出现了电融合技术，并已经有了专门的仪器。

(1) 病毒诱导细胞融合。有许多种病毒能够介导细胞的融合，比如疱疹病毒、天花病毒、黏液病毒、新城鸡瘟病毒、仙台病毒等。其中应用最广泛的是仙台病毒 HVJ（又称副流感病毒 I 或日本凝血病毒）。在应用病毒进行诱导融合时，首先要对病毒进行灭活处理。

HVJ 是副黏液病毒类中的一种副流感型病毒，为 RNA 病毒。仙台病毒颗粒是多形的，直径约 500nm，内核为 RNA，外围为含脂质的被膜，被膜的外表面有许多长 8~10nm 的突起物，该病毒融合细胞的能力在于被膜。仙台病毒毒力低，对人危害小，融合效力较高，而且病毒体广泛存在于各类细胞中，且容易被紫外线或 β -丙炔内酯所灭活，它已经成为病毒融合剂的代表。

病毒介导细胞融合具体过程，在电子显微镜和光学显微镜下可以仔细观察。首先是细胞表面吸附许多病毒粒子，接着是细胞发生凝集；几分钟或几十分钟后，病毒粒子从细胞表面消失，而且就在这些部位，相邻细胞的细胞膜融合，胞质得以相互交流，最后形成融合细胞。细胞融合的发生，与病毒和细胞的种类、病毒数量、温度、周围环境中离子强度等条件有关。例如单纯疱疹病毒可在 HeLa 细胞中引起融合，但是不能在人的二倍体成纤维细胞中诱发融合现象。每个细胞吸附的病毒粒子必须足够多，因为只有相邻细胞的接触部位存在许多病毒颗粒时才有可能发生细胞融合。

病毒诱导的细胞融合也有缺点，比如制备困难，每批病毒的效价差别大，实验的重复性不是非常好，灭活不完全时，有病毒感染的危险。

(2) 化学因子诱导的细胞融合。20 世纪 70 年代是化学诱导融合快速发展的时期，现在应用也非常广泛，常用的化学融合剂有以下几类：①高级脂肪酸衍生物，如甘油-醋酸酯、油酸、油脂等；②脂质体，如磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸等；③钙离子；④特殊结构的水溶性高分子化合

物，如聚乙二醇；⑤水溶性蛋白质和多肽，如牛血清蛋白、多聚 L-赖氨酸、蜂毒溶血肽等。

在这些融合剂中，聚乙二醇是应用最广泛的。聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)，分子式是 $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{O}\cdot\text{CH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}$ ，是乙二醇的多聚体，为白色微黄蜡状固体，有轻微臭味，可溶于水，存在一系列不同分子量的多聚体，一般分子量在 200~6 000 之间的都可以作为融合剂，但以分子量 1 000 为最好。PEG 的水溶性极强，在液相介质中，它表面的许多醚键带有微弱的负电荷，在 Ca^{2+} 离子的参与下，PEG 将带正电荷的表面蛋白或带负电荷的糖蛋白，通过 Ca^{2+} 桥连在一起，使细胞发生聚集、融合；另外在高浓度 (50%) 下，PEG 溶液中的自由水消失，导致细胞脱水而发生质膜结构的变化，由此引起细胞的融合。运用 PEG 进行细胞融合具有很多优点：通用性好，既能诱发植物细胞的融合，又能促使动物细胞融合，而且能诱导动物细胞和植物细胞、人与植物细胞的融合；比病毒容易制备和控制；作为表面活性剂，活性稳定，使用方便。在用 PEG 进行细胞融合时，必须有 Ca^{2+} 的参与。也有研究报道，PEG 与二甲亚砜 (DM-SO) 并用时效果更好。

用 PEG 作为融合剂，也有一些问题。首先，其有效浓度的范围比较窄，最适浓度是 50%~55%，但此时对细胞的毒害比较大；不能在显微镜下观察细胞的融合过程，诱导产生杂交细胞的频率在 1×10^{-5} 这一较低的水平。

(3) 电融合方法。电诱导细胞融合 (electrofusion) 技术在 20 世纪 70 年代末已开始建立 (Senda 首次提供了植物原生质体电融合的证据)，在 80 年代得到了快速的发展，从 1984 年开始步入实用化阶段。

细胞电融合技术，简单地说，就是细胞在电场中，使细胞极化成偶极子，并沿电力线排列成串，然后用高强度、短时程的电脉冲击穿细胞膜，使其产生小孔，从而使两个或几个相互靠近的细胞融合在一起。

电融合技术可以分为两个主要步骤。第一步，经电介质电泳使待融合的细胞形成珠串，因为促进细胞融合的先决条件是被融合的细胞之间彼此应该处于紧密的膜接触状态，由于细胞本身的布朗运动和表面所带电荷的静电斥力，悬浮细胞很难达到彼此相互紧密接触的状态。为了使原生质体紧密结合，可以采用双向电泳技术来达到这一目的。所谓双向电泳是指在一个非均一的电场中，作用于中性粒子的净电力方向上使该粒子产生运动来讲的。当细胞朝着最大电场强度的方向移动时，由于在非均一电场中产生偶极矩的原因，临近细胞彼此吸附，形成链似的细胞凝集，类似于念珠和珍珠链。第二步，可逆电击穿触发细胞融合。形成细胞珠串只是为融合创造了条件，可逆电击穿孔才是细胞融合的实质。当细胞在低压高频非均匀的电场 (一般为 $10\sim 100\text{V}/\text{cm}$ ， $10\sim 80\text{MHz}$) 作用下形成串珠后，对其施加一短促而又高强度的直流电脉冲 (一般为 $0.5\sim 10\text{kV}/\text{cm}$ ， $3\sim 50\text{ms}$)，引起接触区域的质膜发生可逆性电击穿，随之引起细胞融合。在融合过程中，温度、电导等参数都会影响融合率，不同的膜活性物质吸附或包埋在脂双层中也能影响融合产率。如色氨酸、血清球蛋白、环糊精、Tween-80 等存在时能增加细胞之间的融合，而蓝色葡聚糖、EDTA、道诺霉素和氯化钙等的作用则相反。

电融合是一种空间定向、时间同步的可控式的细胞融合技术，它效率高 (融合率是 PEG 的 100 倍)，操作简单、快速，没有残余毒性，而且具有普遍性，可用于动物、植物和微生物等各类细胞，对研究来讲，还可以在显微镜下观察融合过程。

电融合仪器的出现使这项技术的应用更加方便、简洁，除了非专一融合外，还发展了电融合技术的种种改进方法，比如细胞物理聚集电融合法、细胞化学聚集电融合法和特异性电容法等。

(4) 其他方法。除了这些方法外，还有一些新的促进细胞融合的方法不断涌现出来。激光细胞融合就是其中的一种。这种方法又称为激光细胞焊接，具有非常明显的优点：能选择任意两个细胞进行融合，作用于细胞的应力和障碍小，可进行非接触、安全且远距离的无菌操作，而且也能够适时观察融合过程。激光细胞融合离不开激光精密微加工系统，该系统如图 5-2 所示，基本结构为激光器、照射部位控制器、图像处理等 3 个部分。早在 1987 年和 1989 年，德国海德堡理化研究所相继报道了用激光诱导哺乳动物细胞和植物原生质体融合的过程，从开始照射到完成融合，只需几秒钟的时间，对融合产物进行观察，发现细胞质仍在运动，证明融合后细胞是存活的。研究者还将大鼠 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞成对相连，形成预杂种，然后用激光微束装置聚焦定位照射，使分离它们的膜消失而完全融合，最后形成杂交细胞，整个过程历时 5min。

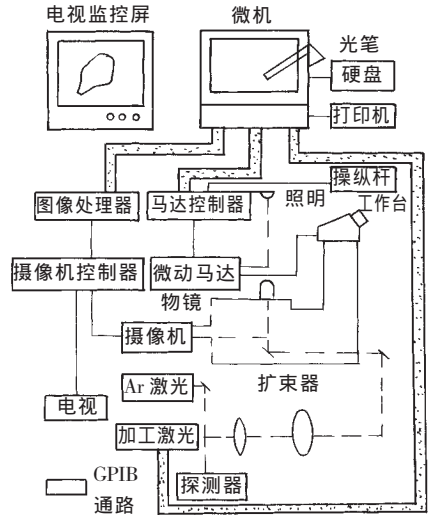


图 5-2 细胞微细加工用激光精密微加工系统

(二) 细胞拆分

细胞拆分技术就是把细胞核或细胞系与细胞质分离开来，然后把不同来源的细胞质和细胞核(器)配合，形成杂交细胞。细胞拆分包括核移植和细胞器移植，前者用于动物比较多，后者则多用于植物细胞，涉及的方法主要有显微注射法、小细胞融合技术、微细胞融合技术、叶绿体及线粒体的纯化转移等。

细胞核移植是通过显微注射法将一个细胞核注入到动物的去核卵中，重构卵的发育、生长，并成为完整个体。这种技术在研究胚胎发育过程中细胞核和细胞质的功能及相互关系、探讨有关遗传发育和细胞分化等方面很有帮助，并且在动物育种的应用方面发挥了很大作用。此项研究最早报道的是变形虫的核移植研究 (Commandon 和 Fonbrune, 1939)，1952 年开始应用于两栖类中，将早期胚胎的细胞核移植到事先去掉或杀死了细胞核的卵细胞质中，获得了成功，并得到了各种类型的异常和正常的个体。对于核移植来讲，简单讲就是先将细胞分散，然后将细胞吸入微吸管，借助吸管壁的压力把细胞膜挤破，把细胞核及其外面包裹着的一层细胞质一同注入到受体细胞，移核过程中应该避免核与外界的接触，核外的一薄层细胞质起着重要的保护作用。核移植研究较多的是两栖类，如非洲爪蟾、硬骨鱼等。在研究理论问题的同时，也开展了将这种技术用于改良动物品种的研究。现在，哺乳动物和植物的核移植都已经获得成功。

细胞器的移植是将一个细胞的细胞器移到另一个细胞中，借以改变细胞的某种特性，以观察由不同来源的细胞器与细胞质重新组成的细胞所表现的功能发生什么变化。通常移植的细胞器是线粒体和叶绿体，除了基础研究外，还用于改良农作物品种。

显微注射技术是显微操作技术的一种，技术性较强，需要一段时间的实际操作才能逐渐掌

握。该技术是将一个细胞核用显微注射的方法置于另一个细胞中，前者称为供体，后者称为受体。这项技术可以分为细胞的显微注射和囊胚的显微注射两种。到现在为止，受体大多是动物的卵子，因为它体积大，操作容易，且通过发育可以把性状表现出来。卵子在接受另一个细胞核之前，必须被激活以获得发育能力，而原有的核可以去掉也可以保留。各种组织或器官的细胞都可以作为供体。

(三) 细胞培养技术

细胞培养技术是生物工程中的一项重要技术，各种生物工程技术无不与细胞培养有关，而且为了使细胞产品适应工业化大规模生产，必须发展大规模细胞培养技术。

据记载，最早进行组织培养的是德国人 Roux (1885) 年，用温生理盐水培育鸡胚组织，使之存活了数月之久。20 世纪初，Harrison 和 Careel (1907, 1910) 创建了盖玻片覆盖玻璃的悬滴培养法，建立了体外培养组织和细胞的基本模式。后来，许多学者对培养容器、培养液和操作技术进行了革新和改进。20 世纪中叶，Dulbecco 等 (1957) 用胰蛋白酶消化处理组织，获得了单层细胞培养，推动了细胞培养技术的发展。目前，全世界已建立的细胞株和细胞系已有数千种，包括人和动物的正常细胞、肿瘤细胞以及遗传缺陷型细胞。细胞培养已经成为细胞生物学、分子生物学、肿瘤学、遗传学和免疫学等学科的重要技术，同时成为生物工程的生产手段，如大规模中空纤维培养法，可使多种生物制品（如激素、生长因子和单克隆抗体等）进行工业化生产。

细胞培养需要一定的生存条件，如合适的营养物质和环境（包括无菌环境、温度、气体、酸碱度、渗透压、培养底物或介质等）。常用的细胞培养方法有单细胞培养法、静止二维单层培养法、静止三维培养法、静止悬浮培养法、转管培养法和摇动培养法等。

动物、植物、微生物的培养条件和操作各有不同，在后面的内容中有较详细的介绍。动物细胞培养是生产许多临床和医学上重要生物制品的有效方法；植物培养可以达到快速育种的目的，选育优良品种，获得一些重要的提取物；微生物细胞培养则应用的更加广泛，比如和日常生活关系密切的各种微生物发酵产品，酒类（啤酒、黄酒、白酒），有机酸（谷氨酸、柠檬酸）以及动物饲料的单细胞蛋白等，利用微生物培养，也可以生产许多经济价值非常高的物质，多为各种药物和酶类。

三、细胞工程产业化的实现

细胞工程技术是实现细胞工程产品产业化的重要手段，通过研究目标产品所需的环境条件，建立一系列高表达、低消耗、稳定均一的下游加工制造工艺，从而完成从实验室到生产规模整个生产形式的转变，实现目标产品生产的规范化、产业化，以满足大量市场应用的需要。

(一) 细胞工程产业化的实施过程

细胞工程产业化的实施过程主要分为三个阶段：实验室规模、中试规模和生产规模。

1. 实验室规模 该规模主要是在实验室用细胞工程或基因工程手段筛选出特异性、亲和性和表达产量均高的有关抗体，以及分泌或表达产物稳定的细胞系，并确定这些细胞对培养环境、培养条件（如温度、pH、营养成分）等因素的有关要求。

2. 中试规模 由实验室研究转入中试阶段。此阶段主要是对培养细胞进行中试放大，即由

方瓶或摇瓶培养转入小规模生物反应器内培养。此种反应器的规模通常为 1~5L。中试放大的主要任务是,对细胞系在大规模放大培养时的有关营养物质的要求和环境条件等进行实验,以确定最佳的培养方式和生产过程的系统控制方案,并建立下游目标产品的浓缩、分离、纯化及质控标准。

3. 生产规模 在完成中试研究后,为实现有关产品的产业化,就必须建立符合一定标准的生产厂房,解决由小型生物反应器放大到生产型反应器的有关工程问题,以及转入生产规模时的有关控制参数,建立下游目标产品大规模纯化、冻干和分装的生产线。

(二) 细胞工程产业化的主要生产型式

1. 生物反应器大规模生产 生物反应器大规模生产是指通过发酵罐、中空纤维和固定床灌流等生物反应器培养系统,在体外对工程细胞进行大规模培养以产生大量产物,再通过相关的纯化手段浓缩纯化目的产物。现以杂交瘤细胞产生单克隆抗体的生产过程为例进行说明。杂交瘤细胞属半悬浮培养细胞,在大规模培养放大过程中既可以采用悬浮培养的方式,也可以采取载体微囊固定培养。目前用生物反应器在体外生产单克隆抗体,一般采用两个基本策略:①大容量高密度悬浮培养法,如采用气升式或搅拌式生物反应器,进行分批式培养。该方法的主要特点是:生物反应器工程结构较为简单,动力学方面如搅拌功率、通气量可按比例地放大,剪切力低并可达到高氧传递等。②采用相对小的容积、高密度的细胞培养系统,如中空纤维的灌流培养、固定床巨载体灌流培养和微囊培养等。实际上,啤酒和柠檬酸生产中的大型发酵罐生产就是非常典型的例子。

2. 转基因动物体内生产 转基因动物技术是 20 世纪 80 年代初发展起来的生物高新技术,对生命科学的发展具有重大的推动作用。要获得转基因动物,需要借助基因工程技术将外源目的基因通过生殖细胞或早期胚胎导入个体的染色体上,并使其在基因组内稳定地整合表达,并能遗传给后代。简言之,转基因动物是指以实验方法导入外源基因,在其染色体基因组内稳定整合并能遗传给后代的一类动物。

转基因动物技术在分子生物学、分子遗传学、肿瘤学、医学、生物制药及畜牧学等领域已经得到广泛应用。在生物活性物质的研制与生产中,将有应用价值蛋白质基因导入家畜或家禽的受精卵中,在发育成的转基因动物的乳汁、血液或其他体液中收获基因产物,这就是所谓的“动物生物反应器”。在此系统中动物就像一个活的生物反应器,除温度、pH 和氧气由动物本身自动控制外,本质上与动物细胞的培养或微生物发酵罐系统并无差别,都是通过生物的基本单位——细胞来表达外源基因产物,由此很可能发展成新型的制药工艺基地——分子农场(molecular farming)或基因农场(gene farming)。

第二节 微生物细胞工程及其在食品工业中的应用

细胞工程应用于微生物中的最常用的技术是细胞融合和细胞培养,后者是发酵工程的手段。在大多数情况下,微生物的细胞培养并不单独列在细胞工程中。这一节重点介绍微生物的细胞融合及其在食品工业中的应用。

一、微生物原生质体融合的优点

微生物与人类生活的许多方面都有着极为密切的关系。长期以来，利用物理方法和化学方法处理微生物是选育高产优质变种的行之有效的经典方法，在培育多种抗生素、氨基酸、核苷酸及酶的高产菌种方面起了很大作用。但是也存在着很多不足之处，比如工作量非常大，有很大的盲目性，而且在连续多次处理达到饱和后就很难再进一步提高。此外，这类方法对某些菌种是不适合的。

微生物原生质体融合正是解决这些问题的良好途径。原生质体融合技术不仅能使遗传基因高频重组，而且可以集双亲优良遗传性状于一体，自从 Schaeffer 等人成功地进行了微生物原生质体融合以来，这项技术便广为人们所接受。微生物细胞具有细胞壁，在进行细胞融合操作前，必须将细胞壁脱除，得到原生质体。微生物原生质体的融合具有以下几个优点。

（一）有较高的诱变率

去除了细胞壁的障碍，如直接用诱变剂处理，诱变效率比较高，特别是对那些本来对诱变剂作用不敏感的微生物。没有细胞壁的障碍，即使是接合型不同的真菌或酵母细胞也能发生原生质体的相互融合。

（二）重组子类型多

原生质体融合后，两个亲株的整套基因相互接触，可以有充分的机会发生多次交换，产生各种各样的基因组合而得到多种类型的重组子；而且参与融合的亲株数不限于两个，可以多至三个、四个，这是一般杂交所不可能达到的。

（三）有较高的融合率

借助各种方法（前面已经介绍过），可以得到比较高的融合率。

（四）可与多种育种方法结合使用

融合技术可以和其他多种育种方法相结合，将用其他方法得到的具有优良性状良种作为亲株，通过融合将性状组合到另外的单株中。

（五）有较高的筛选率

可以用温度、药物和紫外线照射等处理钝化亲株的一方或双方，然后再使之融合，这样可以在筛选中除去某一亲株一方的不良性状，这样做往往可以提高筛选的效率。

由于具有以上的优点，因此微生物原生质体融合育种培育新菌株的技术是十分有用的细胞工程技术，而且利用该技术来选育工业良种也受到国内外的普遍重视。

二、微生物细胞融合

微生物原生质体融合技术已经得到了广泛的应用，实验方法也日趋完善，实践证明它是一种非常有效的育种方法，其具体的过程和操作由于微生物的差异而有不同，但基本步骤是相同的。

(一) 微生物原生质体的制备

为制备微生物原生质体，首先必须有效地除去包裹在细胞外层的细胞壁。虽然可以采用包括机械压榨等许多方法来瓦解细胞壁，但是为了保证原生质体的完善，不使机械力破碎细胞膜，所以一般采用酶法去壁。由于各种微生物细胞的细胞壁在组成上不尽相同，所以操作对象不同采用的酶也不同。

1. 亲本菌株的标记 如何将亲本菌株与杂种细胞有效地分离是原生质体融合技术中非常关键的一步。亲本的标记是否适于融合子的有效检出和融合子中优良形状的保持有很大的关系。因此在菌株的融合前，一定要做好两个亲本的标记。常采用的亲本标记主要有以下几种。

(1) 营养缺陷型标记。在这种方法中，两个亲本常经诱变而带有不同且在融合子中可以互补的营养缺陷标记，亲本不能在基本培养基上生长，而杂合子可以。陈昌海等在用原生质体融合技术构建糖化型酿酒酵母时，两个亲本分别是 $\text{Ala}^- \text{Cys}^-$ 和 $\text{His}^- \text{Thr}^-$ 营养缺陷型。

(2) 抗药性标记。王云六(1987)等曾用抗药性标记进行了苏云金杆菌库斯塔基变种间的原生质体融合。

(3) 荧光标记。此标记法用不同的荧光色素染色双亲原生质体，使其在特定波长的激发光下显现不同的颜色。在荧光显微镜下，用显微操作器挑出具有双亲两种荧光色的单个细胞，即为融合子。在这种方法中，荧光色素的确定既要考虑荧光色素对原生质体的影响，又要考虑颜色的分辨，是比较难于进行的。

(4) 失活原生质体供体法。亲本之一经过用紫外线、热或化学方法处理失活作为基因的供体与正常的未经处理的另一亲本细胞融合。周东坡等(1999)通过灭活原生质体融合技术获得了酿酒酵母新菌株，Fodor等早在1978年就曾在50℃下处理120min使野生型巨大芽孢杆菌KM的原生质体失活，并与营养缺陷型巨大芽孢杆菌的未失活原生质体融合，方便地筛选到了理想的杂合子。

2. 不同微生物细胞壁的消化 细菌细胞壁的主要成分是肽多糖，它是由N-乙酰葡糖胺(G)、N-乙酰胞壁酸(M)和一段小肽组成，组成这段小肽的氨基酸是L-丙氨酸、D-谷氨酸、内消旋二氨基庚二酸(DAP)及D-丙氨酸。一般采用溶菌酶处理就可达到细胞壁消化的目的。主要的细菌细胞壁溶解酶可以分为两大类：作用于糖苷键的糖苷酶类和作用于酰胺部分和肽部分的酶。前者也称为自溶素，在微生物的细胞自溶中起重要作用；后一类酶包括了切开肽聚糖中肽段部分肽键的肽酶。

放线菌是一类形态及分化特征较独特的微生物，它在分类上属于革兰氏阳性细菌，它的细胞壁结构也类似于其他革兰氏阳性菌，以肽聚糖为其主要成分。对于一般的放线菌，常用蛋清溶菌酶来处理。

真菌的细胞壁和细菌的细胞壁在组成上有明显的不同，主要是纤维素、几丁质和葡聚糖等，因而对真菌细胞壁的消化，需采用相应的酶。酵母常用蜗牛消化酶和酵母裂解酶，青霉菌多用纤维素酶、 α -1,3糖苷酶等，曲霉用 β -1,3和 β -1,4糖苷酶等来处理，头孢菌多采用纤维素酶或溶菌酶。

对于原生质体的制备，甘志波(1994)等报道了将机械化方法和酶法相结合的措施。结果表明，捣碎-酶法能明显提高原生质体的形成量，尤其是当使用粗糙圆头玻璃棒捣碎菌丝时。其原因

可能是因为在机械捣碎菌膜的过程中,使菌丝体断裂和菌丝间的连接分开,同时,使细胞壁破损,因此增加了细胞壁对溶菌酶的敏感性。此法适用于丝状真菌原生质体的制备。

3. 影响原生质体形成的因素 原生质体融合技术的应用目的是获得具有再生活性高的原生质体。为了提高原生质体的形成率,许多学者作了大量的工作,较为全面地研究了影响原生质体形成率的因素,主要包括菌龄、菌体生长培养条件、酶作用条件等。

微生物菌体的不同生长时期,所表现的生理状况不同,不同生长时期的微生物细胞的细胞壁对脱壁促进剂的敏感程度可能会存在很大的不同。一般而言,对数生长期的菌体容易被溶菌酶脱壁,原生质体的生成率是最高的,而在其他时期原生质体的生成量会有比较大的不同,特别是在稳定期,其得率会急剧下降。因此在制备原生质体时,要选择菌体生长的适宜时期进行处理,做好前期的菌体培养工作。

微生物培养过程的状况也会大大的影响原生质体的得率,可以分为两个方面,一是培养基成分的影响,一是培养方法的影响。1976年 Peberdy 用构巢曲霉 (*A. nidulans*) 做的研究表明,生长于葡萄糖-盐培养基的菌丝体比添加了酵母膏的培养基培养的菌丝体有利于原生质体的形成,降低磷浓度和加入螯合剂均可显著提高构巢曲霉的原生质体的得率。Sagara 等发现,当链霉菌继代培养于含有一定量甘氨酸培养基中时,对溶菌酶的敏感性明显增加,而某些细菌处于含高浓度的甘氨酸的培养基时,会失去细胞壁。这是因为,甘氨酸代替了肽聚糖中的丙氨酸残基,干扰了细胞壁的形成。青霉素可以抑制细胞壁的合成,冯清平和薛林贵 1997 年在研究地衣芽孢杆菌原生质体的形成时发现,不同生长时期加入青霉素对原生质体形成有比较大的影响,对数期的中期在培养基中加入亚适量的青霉素,可以提高原生质体的得率。对于放线菌而言,在培养基中加入甘氨酸培养,也可以提高原生质体的产生,但对于具体的菌种,由于细胞壁组成的差异,所用的浓度有所不同。另外,在菌丝生长时添加适量的蔗糖也能提高溶菌酶消化细胞壁的敏感性,但是蔗糖的浓度也应该随着菌种的不同而不同,如庆丰链霉菌需要的蔗糖浓度为 10%,吸水链霉菌井冈变种需要的浓度为 15%。至于蔗糖的作用,可能是由于扰乱了菌体代谢的结果。对培养方法的影响的研究不如对培养基成分的影响研究的广泛,甘志波对丝状真菌的培养方法进行了比较,在液体摇床培养、固体玻璃纸培养和液体静止法对黑曲霉 AMS-11 培养中,发现第三种效果要好的多。

借助于酶法脱壁时,酶的用量和处理时间会很明显影响原生质体的生成。比如,刘依强等(1994年)在对芽孢杆菌原生质体的形成、再生及种间融合的研究中报道,原生质体形成率随酶浓度的增加而提高,当溶菌酶的浓度为 $0.5\text{mg}/\mu\text{L}$ 时,菌株 TG₂₆₋₁₀ 原生质体的形成率为 94.1%,菌株 AS_{1.904-17} 的原生质体形成率为 86.2%;当浓度提高至 $0.75\text{mg}/\mu\text{L}$ 时,两亲株的原生质体形成率分别为 98.5% 和 93.9%。施庆珊等(2000年)在用原生质体融合选育肌苷产生菌产氨短杆菌 GMA-2802 时,用溶菌酶处理亲本时发现,当酶浓度在 $0.6\text{g}/\mu\text{L}$ 时,酶解时间为 30、60 和 120min,原生质体形成率分别为 60%、90% 和 99%,但酶解时间太长,会影响原生质体的再生率。

原生质体一旦形成,就必须处于一个适当渗透压的环境中,这样才能免于破裂,因为原生质体是由半透膜包裹着细胞质的圆球,在低渗环境中,水分会通过细胞膜进入原生质体,使之不断膨胀而破裂。不同种微生物所用的稳定剂各不相同,细菌常用 SMM 液(主要成分是蔗糖

0.5mol/L, 顺丁二烯 0.02mol/L, MgCl₂ 0.02mol/L), 真菌常用的是 0.4~0.8mol/L KCl 溶液和 0.3~1.0mol/L 的 NaCl 溶液, 酵母用多种糖及糖醇作稳定液。

(二) 原生质体的再生

用原生质体融合进行育种的一个必要环节是必须使原生质体再生成细胞。对原生质体技术来讲, 使原生质体重新生长出细胞壁, 回复到完整的细胞形态称为原生质体的再生。原生质体只有再生, 才能对其后代进行遗传鉴定, 而且再生率的高低, 将直接影响原生质体融合育种的重组效果。

原生质体的再生的条件要求比较严格, 而且不同微生物又有所不同, 甚至一些非常近似的种, 其最适的再生条件也在再生培养基营养成分及其他条件(如培养温度等方面)有所差别。原生质体的再生条件中, 都有一个最重要的共同点, 需要高渗透压环境。不同微生物原生质体的再生, 各有其最适合的再生培养基。比如芽孢杆菌原生质体的再生培养基可以用 CM 培养基(胰蛋白胨 1%, 酵母提取物 0.5%, 葡萄糖 0.5%, NaCl 0.5%, 琼脂 1.5%, pH 7.0~7.2) 加入 0.5mol/L 甘露醇、0.02mol/L MgCl₂·6H₂O。枯草杆菌原生质体的再生培养基一般采用 DPA 培养基, 其成分为水解酪蛋白 5g, KH₂PO₄ 1.5g, K₂HPO₄ 3.5g, 葡萄糖 5g, 色氨酸 0.1g, 马岛血清 5mL, 琼脂 2%, 琥珀酸钠 0.5mol/L, MgCl₂·6H₂O 0.02mol/L, 用 1 000mL 水配制, pH7.3。

在原生质体的制备中, 能再生细胞壁回复成细胞形态的总是只是其中一部分, 原生质体的再生率可以按照下面的公式来计算:

$$\text{原生质体再生率} = \frac{\text{原生质体平板培养菌落} - \text{处理后剩余菌落数}}{\text{制备原生质体球状体数}} \times 100\%$$

为了求得较高的再生率, 在试验过程中要求操作条件温和, 避免因为机械力量引起原生质体的破碎。再生用的平板培养基在涂布之前, 宜先除去培养基表面多余的冷凝水。另外, 原生质体的再生活性和原生质体制备中的一些条件也密切相关。比如菌龄, 以吸水链霉菌变种为例, 菌龄 12h 时(对数中期)菌丝体的原生质体再生率为 47.88%, 16h 时(对数后期)再生率为 21.98%, 而 24h 时(静止期)再生率则只有 1.15%。用酶进行脱壁时, 酶的用量和作用时间对原生质体的再生也可能有比较大的影响, 前面提到刘依强等人对芽孢杆菌原生质体的形成和再生进行的研究中, 除了发现酶的用量和作用时间对原生质体的形成有大的影响外, 发现这两者对再生也有比较明显的影响。用溶菌酶对亲本细胞进行处理, 溶菌酶浓度为 0.5mg/mL 时, 菌种 AS1.904-17 和 TG26-10 的原生质体的再生率分别为 10.5% 和 18.26%, 当浓度提高为 0.75mg/mL 时, 再生率分别为 8.63% 和 13.5%; 随着酶处理时间的延长, 再生率不断下降。

微生物的细胞融合的研究中, 也发现在培养阶段外加某些物质可以提高原生质体的再生率。在枯草芽孢杆菌原生质体再生的研究报告中, 加入细胞壁的引物能有效地提高再生率, 做法是把培养过夜的大肠杆菌肉汤培养物灭菌、离心, 用蒸馏水洗涤两次, 体积浓缩 20 倍, 使用时与等量原生质体悬液混合涂平板, 可以使再生率提高 3~10 倍。冯清平等对地衣芽孢杆菌原生质体的形成进行研究时发现, 地衣芽孢杆菌 53-A₆ 菌株在生长的延滞期加入适量的甘氨酸(1mg/mL), 然后在对数中期和末期分别加入青霉素(提高细胞壁对酶的敏感性)和溶菌酶, 最后测定原生质体的生成率, 其四次对比试验结果如下: 加入甘氨酸的结果依次为 97%、96.8%、97.2% 和 97%, 不加甘氨酸的则依次为 59.8%、62.3%、60.8% 和 60.9%, 差别明显。

(三) 原生质体的融合和杂合子的筛选

微生物原生质体的融合方法可以用前面提到的各种方法,这里简单介绍最普通的聚乙二醇促融法。以酵母菌为例,其过程为:细胞在 YPD 培养基中于 30℃ 振荡培养 17h→收集并洗涤细胞,用蜗牛酶在 30℃ 处理 4h→洗涤原生质体,由两亲株制备混合的原生质体悬浮液→用 PEG 和 Ca^{2+} 处理,离心 15min→将原生质体包埋在培养基中培养一周。最后,将重组子筛选出来。

杂合子的筛选要根据亲本的标记来决定,常用的手段有两种:直接法和间接法。前者是将融合液涂布于不补充两个亲株必须营养物质(基础培养基)或补充有两种抗性标记对应药物的培养基(选择培养基)上,直接筛选出杂合子。后者将融合液涂布于营养丰富的再生培养基上,使未融合的和融合的都生长出来,然后用影印法接种在对应的基础培养基或选择培养基上,经过对照选出杂合子。

三、微生物细胞融合技术在食品工业中的应用

由于原生质体融合技术的优点,使它在改变微生物遗传性状方面具有独特的优势,利用细胞工程技术来培育应用微生物的良种,国内外已经开展了广泛的工作,并取得了可喜的成果。

(一) 酵母菌的育种

酵母是人类驯化和使用最早的微生物,在现代食品工业中,占有非常重要的地位,因此以它为目标的研究开展得非常广泛。自从 1977 年 Ferencz 等首次将原生质体融合技术应用于酵母以来,关于酵母菌的种间融合和种内融合有大量报道。

酒精发酵中,在环境温度较高的地区,普通酵母菌难以进行正常发酵,必须配备制冷设备才能维持正常的生产,即使在春、秋、冬三季,欲控制正常发酵温度(34℃),也要消耗大量的冷却水和电能,因此选育高温酵母意义重大。长期以来,这方面的工作主要集中于高温驯化和自然界筛选,Stetei 等曾报道了通过原生质体融合技术获得了 42℃ 条件下发酵产率为 6.0% 的耐高温酵母。文铁桥和赵学慧(1999)则采用以下两株菌进行细胞融合以求获得耐高温的酵母新品种:酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) A₀₀₁,能发酵麦芽糖,但在 45℃ 条件下不能生长;克鲁维酵母(*Kluyveromyces* sp.) Y₀₃₄,不能发酵麦芽糖,但可以在 45℃ 下生长。经用蜗牛酶处理制备原生质体,并通过 PEG 进行融合,最终得到了两株融合子 AY₀₂₃和 AY₆₈₀,遗传性状比较稳定,获得了双亲的优良性状,具有在 45℃ 培养条件下产酒率 7.4% 的能力。方霭琪和李绍兰等(1990)也对耐热酵母与酿酒酵母进行了融合研究,方霭琪从云南温泉中分离到在 45℃ 生长良好的耐热酵母假丝酵母(*Candida* sp.);李绍兰利用甘蔗糖蜜生产酒精的生产菌株,首先通过化学试剂诱变使两个亲本分别具有营养缺陷标记 Lys^- 和 Arg^- ,助融剂为 35% 的聚乙二醇(PEG MW.6000)-10mmol/L 氯化钙溶液,融合后筛选融合子,得到了一株在 40℃ 培养条件下糖的利用率为 94.3%、乙醇产量为 57.9g/L 的属间融合株。

啤酒是大众消费非常普遍的日用饮品,对生产啤酒的酵母菌改造获得更好的生产性能和更好的啤酒风味是非常有意义的。现代啤酒发酵工业中,大罐发酵是广泛应用的方法,理想的酵母菌

株除了要求具有发酵力强,赋予啤酒独特的风味外,最好要有一定的凝集性,在发酵终了时菌体聚集起来,利于后面的工艺操作。江慧修等(1983)用红霉素抗性标记和小菌落呼吸缺陷突变标记一株非凝集性啤酒酿造用酵母 *Saccharomyces carlsbergensis* B₈,该酵母发酵力强,酿酒风味好,然后与强凝集性酵母 *Saccharomyces carlsbergensis* A₄₃进行融合。在融合过程中,采用 Baekon 2000 电融合仪进行电激发原生质体融合,获得了五株稳定的凝集性酵母,并且保留了发酵力强和酿酒风味的特点。

在啤酒工业中,所用的酿酒酵母(即酒精酵母)不具备发酵乳糖的能力,国外已经有人通过原生质体融合技术获得了具有发酵乳糖能力的酵母菌株,国内张博润和蔡金科也做了相关的研究。两个亲本分别是酿酒酵母和克鲁维酵母,后者具有很好的乳糖发酵能力,酿酒酵母与乳酸克鲁维酵母通过聚乙二醇诱导融合,获得了种间融合子,杂合子不仅能发酵葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、棉子糖和蜜二糖,而且可以发酵乳糖,在以乳糖为碳源的培养基中其发酵能力是亲本乳酸克鲁维酵母的两倍。

前面曾经提到灭活原生质体融合技术,该技术在食品工业的啤酒酵母育种中也得到了应用。双亲灭活原生质体技术是首先运用物理的(比如加热、紫外照射等)或化学的方法(比如各种诱变剂)对亲株进行处理,使其丧失生理活性,然后进行融合,通过遗传物质的互补获得具有生理活性的融合子,该技术避免了对亲株进行遗传标记的步骤,也不会发生由此而引起的亲本优良性状的改变。酒精酵母是白酒发酵中应用的一种菌株,具有较高的发酵能力,产酯酵母(即生香酵母)具有产酯能力,在白酒发酵中添加该菌,可以提高白酒醇香浓郁的口味,赵华等首先将两亲本培养到对数期,然后用 β -巯基乙醇-EDTA 在 30℃ 处理 30min,经蜗牛酶处理后,置于 30W 紫外灯下灭活,经融合后,筛选到 6 株遗传性状稳定的既有高发酵能力又有高产酯特性的融合子。在筛选酿酒酵母新菌株方面,周东坡等也运用该技术进行了探索,其出发菌为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) LQ₁₆和 QSB₇,前者是齐齐哈尔啤酒厂的生产菌株,作为亲本前者遗传标记为 Ile⁻Dat⁺,后者为 Ala⁻H₂S⁻,分别通过紫外灭活和加热灭活,助融剂为 PEG,得到融合子,经检测,该遗传性状稳定的杂合子具有口味独特、发酵度高、絮凝性强的优良特性,是一株啤酒生产的新菌株。

(二) 其他食品微生物的育种

芽孢杆菌是一类重要的应用微生物,淀粉酶、蛋白酶都是它的产物,也是应用细胞融合技术研究较多的菌种。自 1976 年以来,芽孢杆菌的原生质体融合开始有了大量的报道。比如用产蛋白酶的芽孢杆菌与地衣芽孢杆菌进行的融合,通过溶菌酶处理得到亲本的原生质体,聚乙二醇作为助融剂,进行融合,得到了一株融合子,其产酶能力比亲本提高了 15%~20%,再经过紫外诱变,得到了产酶能力进一步提高了 20%~30%的具有工业生产价值的高产变种。

乳糖发酵短杆菌和黄色短杆菌是两种重要的氨基酸生产菌,后者是赖氨酸高产菌,但生长缓慢,发酵周期长,生产中染菌的机会大,将它与前者融合后,得到新的赖氨酸生产菌,不仅提高了对葡萄糖的转化率,而且发酵周期也大大缩短,与亲本相比较缩短了 11%。另外,谷氨酸生产菌的细胞融合育种也有大量的报道。

以上只是报道中的一小部分,但已经可见该技术在工业育种中的巨大潜力,并已经取得了很好的成效,已被广泛地应用于食品工业。

第三节 动物细胞工程及其在食品工业中的应用

从操作对象来看,动物细胞工程无疑是细胞工程中的一大组成部分,以动物细胞为目标的细胞大规模培养、细胞拆分、细胞融合等技术也得到了蓬勃的发展,并在科研和实践生产中取得了重大的成果。

一、核移植技术

细胞核移植一词最早出现在 Spemann (1938) 所著的《胚胎发育与诱导》一书中,但当时由于实验条件的限制而未能实现,直到 1952 年,Briggs 和 King 才第一次报道了蛙的胚胎细胞核移植成功。核移植(nuclear transplantation),是指将不同发育时期的胚胎或成体动物的细胞核,利用显微手术和细胞融合方法移植到去核卵母细胞中,重新组成胚胎并使之发育成熟的过程。与胚胎分割技术不同,细胞核移植技术,特别是细胞核连续移植技术可以产生无限个遗传性状相同的个体。由于细胞核移植是产生克隆动物的有效方法,故人们往往把它称为是动物克隆技术,甚至被认为是动物克隆的同义词。

(一) 核移植技术

严格地说,细胞核移植技术只是动物克隆的一项最关键的技术,但并非所有的核移植技术产生的动物个体都是克隆,由于理论和技术的限制,并非所有的动物细胞特别是体细胞还不能像植物细胞那样表现出全能性发育,在多莉羊诞生之前,胚胎核移植技术已经有了比较成熟的发展,但其供体核是已经分化到一定程度的受精卵。1997 年 Wilmur 的多莉羊降世,立即引起了轩然大波,在科技界、政界、法律界、宗教界引起了强烈的反响,因为它开创了体细胞动物克隆的先河,这一研究结果以雄辩的事实推翻了长期以来一直认为分化的动物体细胞不具备发育全能性的观点。这项发明在理论研究和实践应用上都具有十分重大的价值。

1. 克隆的概念 “clone”一词来源于希腊语,其愿意是用离体的细枝或小枝增殖的意思。1903 年 Webber 在《Science》上一篇题为“新的园艺和农业术语”的论文中,使用了“clone”一词,定义为用植物营养器官部分无性繁殖得到的品系。后来该词被生物界所接受,克隆的概念逐渐应用到了植物、动物、微生物和医学方面,并形成了比较一致的概念:克隆是指由一个细胞或个体以无性方式重复分裂或繁殖形成的一群细胞或一群个体,在不发生突变的情况下,一个克隆的成员具有完全相同的遗传结构。随着科技的发展,传统的克隆概念也有了一些改变,对于动物克隆概念来讲,高峰(2000)在报道中认为:凡是不经过受精过程而获得新个体的方法就叫做克隆;或者经核移植技术产生的动物叫做克隆动物。

目前在众多的报道中,几乎都认为经核移植得到的动物个体可以成为克隆动物。严格地说,以胚胎核移植产生不应该称为克隆动物,因为胚胎细胞核的得到仍然经过了受精过程(自然方式或人工方式),目前一般的胚胎核移植技术在一般的细胞工程实验教材中都有详细的过程描述。值得一提的是多莉之父 Wilmur 在其论文中,虽然其供体核来自高度分化的乳腺细胞,但始终未提到“clone”一词,而将多莉称为“重建胚”。

2. 核移植技术与动物克隆 根据供体的不同细胞核移植可分为：胚胎细胞核移植、胚胎干细胞核移植、胎儿成纤维细胞核移植和体细胞核移植。整个动物的克隆操作，主要有以下几个步骤：细胞质受体和核供体的处理和制备、核移植、核移植发育胚胎移入雌性动物体内产生克隆动物。

(1) 普通核移植动物的产生。不同的动物，进行核移植时所采取的具体方式不同。对哺乳动物来讲，一般操作是：供体核的准备是借助显微操作仪，将体内或体外成熟的含有供体核的细胞的细胞质与细胞核分离，得到独立的细胞核；同时，受体细胞做去核处理。卵母细胞的处理，可以借助一根很细的玻璃针小心地在特定的部位插入细胞，然后往上轻轻一挑，卵子中就会流出少量的细胞质，核也就随着流出，也有报道用化学方法、激光或紫外光灭活染色体等方法达到目的，但实践结果表明显微手术法更为简便有效。据范必勤报道（2000）其中又以三种方法最为常用，第一种，在接近第一极体处的透明带作一切口，用移植管挤压卵母细胞，使核和一部分细胞质流出；第二种，在相差显微镜下吸除核及附近约 $1/3$ 的细胞质；第三种，在 DIC（微分干涉差）倒置显微镜的高分辨率视野下使卵母细胞轻微旋转，当纺锤体与焦平面垂直时核区域与卵母细胞质的折光率略有差别，可准确吸除中期核和少量的细胞质。三种去核方法去除细胞质的量不宜过多，应与移入核时所带入的细胞质的量大致相同。

接着，就可以通过显微操作将供体核注入到准备好的受体细胞中。但在这种情况下，该复合体还不具备发育的条件，必须激活，可以使用电刺激使供体核与受体细胞融合在一起，通过化学刺激或采用激光刺激激活移核复合体，最后，在体外或体内培育到桑葚期或囊胚期，再移植到寄母的子宫中，待其发育。其过程可用图 5-3 表示。

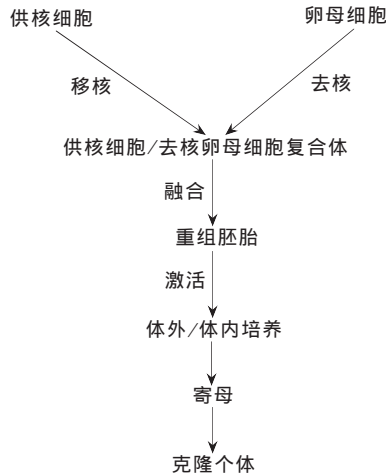


图 5-3 哺乳动物的简单克隆路线

(2) 多莉羊和动物体细胞克隆。罗斯林研究所的资深科学家 Ian Wilmut 和 Keith H.S. Campbell 及其合作者以高度分化的成年母羊乳腺细胞为核供体，克隆出一只绵羊，取名 Dolly。

首先，威尔马特和他的同事们从一只不知姓名的 Finn Dorset 种白色妊娠绵羊的乳腺刮下若

干个膜细胞。通常，这类细胞在 10% 的绵羊胎儿血清中能保持其活性；血清是血液的液体成分，它富含细胞营养物质。但是，Wilmut 意识到，利用使细胞处于休眠状态的标准技术，即将它们置于浓度降低为 0.5% 血清之中，不仅可以使这些细胞“忘记”它们是乳房细胞，而且能使它们“记住”发育成整只绵羊的遗传指令。这是一个重大的突破。以前，其他研究者不理解使细胞遗传物质和接受细胞遗传物质的卵细胞二者在发育上同步的重要性，在其他实验室，基因在由卵细胞激活的发育过程中行进行过于超前。然而，Wilmut 从 Finn Dorset 种母羊摘取的细胞并没有开始分裂 DNA，并将之转译成绵羊特质 (stuff of sheep)。处于休眠状态的乳房细胞的基因极易与卵细胞结合。然后，从形体较小的苏格兰黑面羊摘取卵细胞，通过手术去除其细胞核 (DNA 的载体)。Wilmut 及其研究小组把白羊的乳腺细胞放入黑羊的已去除细胞核的卵细胞中，以一种弗兰肯斯坦 (Frankenstein) 式的技巧，用电脉冲使这些细胞的膜不仅结合在一起，两个细胞即刻合而为一。再则，利用标准的人工繁殖技术，将合成的卵细胞植入一只黑面母羊体内。4 个月之后，这只举世震惊的小羊羔诞生了。人们发现它的颜色是白的，这暗示它与黑面母羊——它的生身之母不属于同一个品种。DNA 测试最终证实，多利确实是一个生物学复制品 (biological copy)。

在技术路线上，Dolly 并没有太大的突破，采用的是传统的胚胎细胞核移植技术。Dolly 克隆成功之后，美国夏威夷大学的 T. Wakayama 等用小鼠卵丘细胞作核供体，克隆出小鼠，而后又成功地用克隆出的小鼠卵丘细胞作核供体，从中克隆出第二代小鼠，共计获得 50 多只克隆小鼠。值得说明的是，克隆小鼠的技术与克隆 Dolly 的技术有所不同，目前国内将克隆小鼠的技术称为“檀香山”技术。之后，日本科学家用牛输卵管上皮细胞作核供体，从中克隆出了两头牛。也有

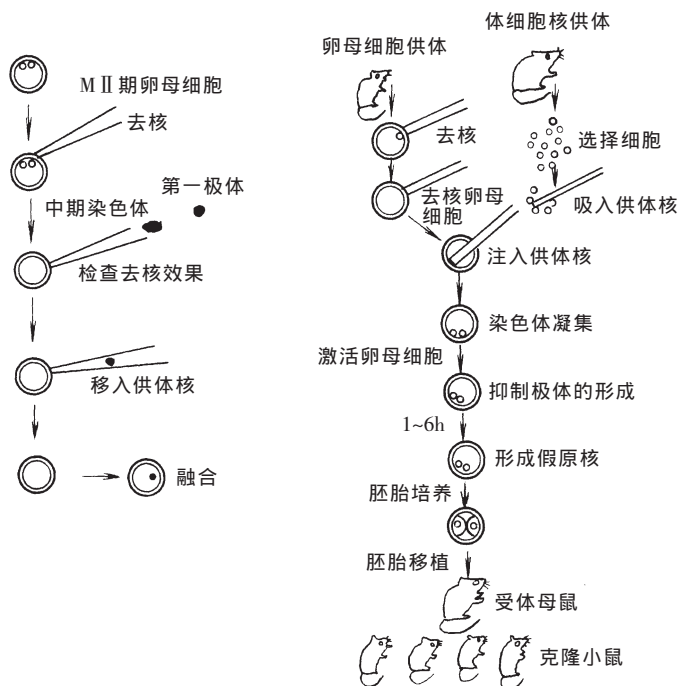


图 5-4 “多莉”技术 (左) 与“檀香山”技术 (右) 的比较

消息 [Nature Biotechnology, 1998, 16 (8): 703] 说日本科学家用成年牛脊背上肌肉细胞中的细胞作核供体, 从中克隆出一头牛。2000 年 6 月, 中国西北农林科技大学利用成年山羊体细胞克隆出两只“克隆羊”, 但其中一只因呼吸系统发育不良而早夭。据介绍, 所采用的克隆技术为该研究组自己研究所得, 与克隆“多莉”的技术完全不同, 这表明我国科学家也掌握了体细胞克隆的尖端技术。

(3) 胚胎核移植技术。哺乳动物胚胎细胞核移植研究的最初成果在 1981 年取得——卡尔·伊门泽和彼得·霍佩用鼠胚胎细胞培育出发育正常的小鼠。1984 年, 施特恩·维拉德森用取自羊的未成熟胚胎细胞克隆出一只活羊, 其他人后来利用牛、猪、山羊、兔和猕猴等各种动物对他采用的实验方法进行了重复实验。1989 年, 维拉德森获得连续移核二代的克隆牛。1994 年, 尼尔·菲尔斯特用发育到至少有 120 个细胞的晚期胚胎克隆牛。到 1995 年, 在主要的哺乳动物中, 胚胎细胞核移植都获得成功。

中国胚胎工程从 20 世纪 60 年代开始, 其研究从鱼类和两栖类的细胞核移植开始。我国著名科学家童第周教授, 于 1960 年开展鱼类及两栖类细胞核移植研究, 现在鲤鲫核移植鱼已大面积繁殖推广。70~80 年代, 胚胎核移植技术得到广泛推广, 1973 年中科院遗传所率先开展哺乳动物胚胎移植, 兔胚胎移植成功。胚胎移植成功的动物还有: 绵羊 (1974 年, 中科院遗传所、内蒙古三北种羊场)、奶牛 (1978 年, 中科院遗传所、上海牛奶公司第七牧场)、山羊 (1980 年, 西北农大)、小鼠 (1980 年, 中科院遗传所)、马 (1982 年, 西北大学)、猪 (陕西武中畜牧所)。70 年代末至 80 年代初, 胚胎冷冻技术开始应用, 在含有冷冻保护剂的溶液里, 将胚胎保存于 -196°C 的液氮中, 需要时, 解冻胚胎并移植获得后代。这项技术广泛应用于牛的繁殖。90 年代实现了连续细胞核移植, 1993 年, 中科院发育所获得第二代核移植山羊。1992—1996 年, 西北农大得到第一代至第五代核移植山羊, 1995 年, 西北农大将滋养层细胞作为供体细胞, 获得山羊。

(二) 核移植技术在相关食品工业中的应用

核移植技术已经应用于诸如单性生殖、核质关系等机理方面的研究, 在动物育种和优良品性的选育中, 发挥了巨大的作用, 以它为核心的克隆动物有着十分重要的应用价值。应用克隆动物的选择方案或杂交方案的效率均高于常规育种。

鱼类细胞核移植研究, 我国一直处于领先地位。生长快、蛋白质含量高的鲤鲫移核鱼已在生产中推广。最近在体细胞克隆鱼的研究也在进行中。对鱼类的研究, 首先是由我国的童第周等在 1963 年首创的, 它比两栖类的研究晚了约 10 年, 比哺乳类早 18 年。从 1963 年到 1999 年为止, 在国外只有前苏联的 Gasaryan (1979) 和日本的 Niwa 等 (1999) 有过报道, 可见我国在鱼类的核移植方面一直独占鳌头。

对经济鱼类的核移植研究首先是从鲤鱼和鲫鱼开始的。这是两种常见的鱼。鲫鱼的特点是味道鲜美, 容易繁殖和饲养, 但个体小; 而鲤鱼生长迅速、个体大, 但是肉质粗厚, 味道差。这两种鱼间的杂交属于远缘杂交, 因此用传统的方法很少能获得成功, 采用核移植技术, 将鲤鱼的囊胚细胞核移植到鲫鱼的去核卵中, 获得第一代鲤鲫移核个体, 这种鱼能长到性成熟, 并能产生后代, 目前已经获得了第四代移核鱼。更为重要的是, 这种鱼具有优良的性状: 生长速度快, 肌肉蛋白质含量比鲤鱼高 3.78%, 脂肪含量比鲤鱼低 5.58%。在四川省双流县做的养殖试验表明,

鲤鲫移核鱼的生长速率比鲤鱼快 22%。该鱼已经作为优良品种在北京市、四川省、湖北省、湖南省和广西壮族自治区等地推广养殖。长江水产研究所和淡水中心，又利用鲤鲫移核鱼生长快的特点，与其他鲤鱼做有性杂交，从而进一步改良品种。严绍颐等 (1991) 对鲤科中不同亚科的草鱼和团头鲂进行核移植研究，获得了核质杂种鱼，经多年的培养，生长正常，其中一条可以产生正常的精子，能与正常的草鱼回交得到生长良好的后代。

在家畜育种方面，我国科学界在“七五”期间已经开始着手核移植技术的基础研究，并首先在兔和山羊上获得成功。通过从一个胚胎复制出大量同一基因型的个体，从而建立胚胎的无性繁殖系，这对家畜育种和畜牧生产、对具有优良遗传品质个体的评定选择和发展都有重要的意义。体细胞核移植技术也是一种比较有前途的方法，用该方法制作转基因动物的突出优点是效率高，因为用核供体的细胞是确证整合了某一外援结构基因的细胞，一旦核移植成功，就意味着得到了转基因动物，这样，就将转基因动物的筛选提前到了细胞水平，而不是在动物水平，不但可以节省时间，对大动物的生物反应器来讲，更降低了成本。哺乳动物的克隆是现在科学研究的一大热点，特别是牛、羊、猪等大型动物的克隆意义重大，已经在促进生长、提高繁殖率、抗病、产生药用蛋白、人类疾病动物模型、异种器官移植等方面获得了多种转基因动物。

可以把哺乳动物克隆研究的发展分为两个阶段。第一阶段是从 1983 年 Willadsen 的绵羊胚胎细胞核移植成功开始，这一阶段的工作解决了以下几个问题：①哺乳动物早期胚胎细胞发育的全能性；②哺乳动物胚胎、组织及个体发育中的印迹现象；③哺乳动物胚胎发育过程中的一些核质关系，核移植的一些技术问题。第二阶段开始于 1997 年多莉诞生以后，它使人们从新的角度来认识开展哺乳动物（特别是猪、羊和牛）克隆研究的意义。现在，哺乳动物的克隆研究取得了飞速发展，表 5-1 列出了最近的一些进展。

表 5-1 哺乳动物克隆的进展

作者	国家	时间(年.月)	动物	供核细胞	克隆动物名称
Wilmot	英国	1997.2	绵羊	乳腺上皮细胞	多莉
Schnieke	英国	1997.8	绵羊	胎儿成纤维细胞(含有人凝血因子)	波莉
ABS 公司	美国	1997.8	牛	胎儿成纤维细胞	基因
Renard	法国	1998.3	牛	胎儿肌肉细胞	马格丽特
Wells	新西兰	1998.4	牛	胎儿成纤维细胞	吉尔
Cibelli	美国	1998.5	牛	胎儿成纤维细胞	乔治
Lzumi	日本	1998.7	牛	输卵管上皮细胞	
Wakayama	美国	1998.7	小鼠	颗粒细胞	
杜森	中国	1998.10	山羊	胎儿成纤维细胞	
Wolf	德国	1999.1	牛	乳腺细胞	乌尔苏拉
Wells	新西兰	1999.4	牛	颗粒细胞	
切·加利利	意大利	1999.9	牛	淋巴细胞	伽利略
杨向中	美籍华裔	2001.6	牛	体细胞	诺曼

注：表中部分资料摘自邹贤刚等的《生物工程进展》。

应该指出的是，目前哺乳动物的克隆还处在大量研究的阶段，还存在很多缺点。通过体细胞核移植技术克隆动物的费用非常高，据 Campbell 报道，用于制作 Dolly 的费用已超过 200 万英镑。效率低也是极明显的，罗斯林研究所历经艰难，从 277 枚融合胚胎中只获得了 1 只发育足月

的 Dolly；即便是使用“檀香山”技术，以分化程度相对较低的卵丘细胞为核供体，其成功率也只有百分之几。此外，生出的部分个体表现出生理或免疫缺陷。以克隆牛为例，大部分克隆牛已先后死去。观察结果表明，因部分犊牛胎盘功能不完善，其血液中含氧量及生长因子的浓度都低于正常水平。

核移植技术在动物上的应用，除了上面提到的鱼外，大部分（特别是大型哺乳动物的克隆）还处于研究阶段，即使有应用，也是主要用于两大方面：一是利用高效表达的克隆转基因动物生产珍贵的医用蛋白；二是用于濒危动物的保护。前者的例子是核移植技术生产乳腺生物反应器的研究，它不仅解决了目的基因的表达和高效表达的问题，而且是限制在乳腺组织的特异表达，它不会影响生物体的正常生长发育。相对于每克 800~5 000 美元的细胞基因工程药物，用乳腺生物反应器生产，每克动物蛋白的成本只要 5 美分，差距悬殊。从这种动物的乳腺里可源源不断地分泌出我们所需要的目的基因产物，因此一个转基因动物就是一个大工厂。用这一技术，1990 年荷兰的科学家培育出世界上第一头转基因牛，成功地从牛奶中分泌出乳铁蛋白。1991 年英国罗斯林研究所和 PPL 公司培育出转基因羊，成功地用羊奶生产抗胰蛋白酶。这种转基因羊的羊奶每升含有价值达 6 000 美元的蛋白酶。如此巨大的经济价值，大大促进了核移植技术的研究。

虽然核移植和动物克隆技术在实际生产上还没有得到广泛应用，但是它作为加快优良动物的大量繁殖和遗传性状改进以及新品种的产生方面的高效的方法，势必会为人类带来巨大的益处。

二、动物细胞培养及其应用

动物细胞的培养也是生物工程中的一项重要技术，但是其主要是应用于生产具有重要医用价值的酶、生长因子、疫苗和单抗等，是医药生物高技术产业的重要部分，在食品中的应用极少有报道，这里对该项技术仅作简单的介绍。

（一）概述

动物细胞的培养既不同于植物细胞，也不同于微生物细胞，有它自己的特点。动物细胞培养是将来自动物体的某些器官或组织的细胞，采用无菌的方法，在人工条件下（模拟体内生理条件），在体外进行培养，使之存活和生长。但在培养中，无论是什么来源的细胞，都不形成组织。在该技术中，有下述几个基本概念需要明确。

细胞系：原代培养物经首次传代成功后即成为细胞系。如果传代有限，可称为有限细胞系；如可连续传代，则称为连续细胞系。

细胞株：通过选择法或克隆从原代培养物或细胞系中获得的具有特殊性质或标志的培养物称为细胞株。

原代培养：以直接取自生物体细胞、组织或器官开始的培养称为原代培养。

传代：无论稀释与否，将细胞从一个培养容器转移或移植到另一个培养容器即称为传代或传代培养。

细胞在机体内生长时，相互依赖，相互制约，而在体外生长时，脱离了平衡系统，因而细胞形态也发生了变化。一般来讲，根据是否能贴附于支持物上生长的特性，培养的细胞可分为两大类：贴附型及悬浮型，后者生长时呈悬浮状。多数细胞都呈贴附型，这类细胞在生长时能贴附在

支持物上生长，而根据贴附的形状又可分为成纤维样细胞型和上皮样细胞型，另外还有比较少见的游走型细胞和多形性细胞型。

(二) 动物细胞培养基

动物细胞的培养对营养的要求比较高，自从 1906 年 Harrison 奠定动物组织培养方法以来，培养基的重要性开始为人们所知。动物细胞培养基是细胞赖以体外生长、增殖、分化的重要因素。根据培养基的来源及成分的明确程度，可将动物细胞培养基的发展分为三个阶段：天然培养基阶段、合成培养基阶段、无血清培养基阶段。

在早期，为了模拟体内的环境，常常采用同种生物的体液，即直接采用某些组织的凝块、生物性液体和组织提取液等作为细胞的培养基。后来随着化学分析和合成技术的发展，人们开始用一些成分明确的物质进行合成培养基的研究，经过不断的研究和改良，建立了适合不同细胞生长的培养基，其基本的营养成分包括：无机离子（平衡盐溶液）、氨基酸、维生素、还原性物质、激素、生长因子等。在实际操作时，合成培养基通常需在其中加入 10% 左右的胎牛或新生牛血清，这样才能较长时间地维持细胞的生长，血清的主要作用在于提供激素（生长因子）、转移蛋白和其他营养物质。严格地讲，添加了牛血清的培养基应称为半合成培养基。但是，血清的来源困难，而且价格昂贵，同时，血清中的成分复杂，各批次之间的差别也很难控制，其中有些成分并不是细胞所必需的。由于血清的成分不明，给深入研究某一物质对细胞生长、分化的作用和机制方面带来很多困难，无血清培养基已成为当今细胞培养领域研究的一大课题。

无血清培养基的优势在于避免了血清的批次、质量、成分等对细胞培养造成的污染、毒性作用和不利于产品纯化等不良影响。在生产疫苗、单抗和各种生物活性蛋白等生物制品的应用领域中，优化无血清培养基的成分可使不同的细胞在最有利于细胞生长和表达目的产物的环境中维持高密度培养。

无血清培养基一般是由基础培养基和替代血清的补充因子所组成。基础培养基是多种营养的混合物，是维持组织生长、发育、繁殖等一系列生命活动的物质基础。补充因子用来代替血清中含有的动物细胞培养时所需要的各种因子，其又可以分为必须补充因子和特殊补充因子，前者主要包括胰岛素和转铁蛋白，后者则有各种生长因子、贴壁因子和激素等。无血清细胞培养作为新兴的生物技术，近来发展非常迅速，它不仅为细胞的生长、增殖、分化的调节机制的研究提供了有力的工具，而且无血清培养基与发酵技术的结合使用是目前大多数生产基因工程产品的厂家发展的理想目标。

(三) 动物细胞培养

根据培养物的细胞生物学，动物细胞培养可以分为原代培养和传代培养；根据培养条件和器皿的不同，又可分为静止培养和动态培养；根据培养基的添加方式，可以分为分批培养、补料培养和连续培养。在彭志英主编的《食品生物学技术》一书中，将培养方式分为灌注悬浮培养、贴壁细胞培养和固定化细胞培养三种。特别适合细胞大规模培养的是灌注培养方法，它出现于 20 世纪 60 年代，为细胞的大规模培养开辟了广阔的天地，在以后的几十年中，得到了迅速的发展，并成为细胞大规模培养的主要手段。在该培养方式中，细胞保留在反应器系统中，收获培养液的同时不断加入新的培养基，同其他方法相比，这种方法培养的目标产物的产率可以提高一个数量级。灌注培养又可以分为两大类：悬浮灌注培养和床层培养。

不管采取何种方式，动物细胞在体外培养时，一般都需要支持物的存在，而多孔载体（porous carrier）是近年来才发展起来的一种适合多种动物细胞大规模高密度培养的优秀支持物。一般来说，理想的细胞支持物应该具有以下几个主要特征：①具有较好的生物相容性；②具有良好的传质和机械稳定性，同时要能保护细胞不受机械伤害；③比表面积大，粒径分布均一；④可重复利用，易清洗；⑤可承受高压灭菌；⑥适合大规模培养；⑦易使细胞、载体和培养基之间相互分离。

多孔载体几乎具备了上述的所有特征，尤其解决了细胞固定化和剪切力对细胞的损伤两大难题，能提高细胞的培养密度，因此受到广泛的关注。用来制备多孔载体的材料比较多，比如明胶、海藻酸钠、纤维素等天然高分子物质，聚乙烯等有机高分子物质，甚至玻璃、陶瓷等无机材料也可以用来制备。制备的方法非常多，具体的方法请参考有关资料。

在大规模细胞培养中，一般都采用生物反应器来实现生产，但由于大量细胞的代谢，细胞培养环境迅速改变，在线过程监控更为重要。离线取样测定特别是产物浓度测定往往需要一天的时间，因此这种测定结果，不能用来及时指导生物反应器有关参数的控制和细胞培养环境的优化，而且频繁取样容易造成污染，增加费用。因此在线测定生物反应器中培养条件、代谢产物和目的产物浓度等大量数据，并对测定结果进行分析处理，及时对培养系统进行反馈性控制是成功进行大规模动物细胞培养的需要。在生物反应器中，温度、pH、溶解氧浓度是细胞培养规模放大的早期研究内容。现在，这三个参数对细胞的影响已经明确，并在培养过程中实行了有效控制。

（四）应用

动物细胞的培养直接应用在食品工业中的非常少，到目前为止，主要用于生产一些具有重要药用价值的生理活性物质，比如激素、疫苗、药用蛋白质等。可以预见，不断成熟的大规模动物细胞培养技术不仅在生产药用蛋白方面，而且在基因治疗、基因疫苗用的病毒载体的生产、人工器官和组织移植用分化细胞的培养等领域都具有广阔的应用前景。

三、其他细胞工程技术在相关食品工业中的应用

细胞工程中的其他技术，如染色体工程、繁殖生物学技术在动物中也有广泛的应用，并且已经在生产上发挥了作用，带来了经济效益。

（一）染色体工程

染色体工程指的是按一定的设计，有计划地削减、添加或代换同种或异种染色体的方法和技术，其中动物多倍体具有比较明显的意义，特别是在水产养殖中。中科院海洋研究所利用细胞工程技术成功地培育出多倍染色体鱼虾，为提高海产品产量和质量创出一条新路。通常多数鱼、虾、蟹、贝类在自然状态下的细胞上有2组染色体，一组来自父系，一组来自母系，从而显示出性别。中科院海洋研究所的科研人员，通过基因工程技术培育出的多倍染色体鱼虾不再具有明显的性别特征，其性腺成熟受到抑制，生长期延长，因而具有特殊的生长优势，个体大、产量高。在同样条件下，二倍体和四倍体的对虾比普通对虾增产10%~15%，三倍体海湾扇贝增产20%~40%。目前，中科院海洋研究所已成功的培育出三倍体对虾、四倍体对虾、三倍体鲍鱼等多种多倍体鱼、虾、贝，多倍体孵化育种技术日趋成熟。据专家介绍，多倍体鱼、虾、贝的抗病力很

强，能有效抑制病害的大面积发生，从而为我国海水养殖业创出一条新路。

鲍鱼素有“软黄金”之称，是我国的传统海产珍品，肉味鲜美，具有很高的营养和药用价值，也是我国最主要海水养殖出口创汇贝类之一。但因其生长速度较慢，生长周期长且病害多，严重制约了鲍鱼养殖业的发展。大连水产学院从1986年开始鲍鱼的三倍体育种研究，历经10年，进入了国家“863”计划，并最终取得了成功。实践证明，三倍体鲍生长速度快，抗病性强，并且口感好，到2000年，已经建立起适应生产规模的操作体系，育种达400万枚。

国外已先后获得了草鱼、鲤、大西洋鲑、银大麻哈鱼、细鳞大麻哈鱼、香鱼、虹鳟、罗非鱼、斑点叉尾、牙鲆、扇贝、牡蛎、对虾、鲍鱼等20余种鱼、虾、贝类的三倍体及四倍体，其中有一些进行了商品化生产，达到了产业化水平。在法国、英国和日本，虹鳟三倍体养殖进入了商业化生产。法国应用染色体加倍技术，培育出四倍体虹鳟，用四倍体虹鳟与二倍体虹鳟配种，繁殖出大量三倍体虹鳟用于生产，其商业化养殖的虹鳟中约有30%是三倍体。日本近年来陆续开发出了三倍体香鱼、牙鲆及全雌三倍体金鲑商业化生产技术，培育出了生长快的不育三倍体香鱼，解决了二倍体香鱼成熟死亡问题。俄罗斯开发出了大批量三倍体鲤生产技术。美国培育出三倍体牡蛎已进入产业化。美国西海岸的牡蛎中80%以上为三倍体，三倍体牡蛎比二倍体增产50%~60%，而且降低了生殖季节的死亡率，但三倍体的抗病力仍有待于进一步的考察。

在鱼类单性生殖和性别控制方面，国外诱导鱼类雌核发育和雄核发育研究取得了很大成绩。法国、日本、挪威等国得到了虹鳟、硬头鳟、大西洋鲑、红点鲑、马苏大麻哈鱼等鱼类的雌核发育系。美国诱导硬头鳟二倍体雄核发育和鲤鱼的雌核和雄核发育系成功。前苏联应用人工诱导鱼类雌核发育技术，获得了20多种鱼的雌核发育鱼，并得到了保持 F_1 杂种优势的雌核发育鲤鲫杂种第二代。匈牙利已建立了鲤鱼的12个雌核发育系，并选出了最佳育种组合作为材料鱼应用于鲤鱼育种，人工诱导雌核发育技术已开始应用于育种实践。加拿大开发了大批量生产全雌大麻哈鱼和大西洋鲑的技术，已达产业化规模，经济效益显著。日本成功地开发了牙鲆、虹鳟、大麻哈鱼等鱼类全雌化生产技术。最近，加拿大成功地分离克隆出了大麻哈鱼Y染色体特异的雄性DNA探针，并在其性别控制研究中得到应用。

（二）繁殖生物学技术

繁殖生物学涉及的技术也比较多，有体外受精技术、胚胎移植技术、家畜的性别决定等。

家畜产品可能因性别而异，如母牛分泌牛奶，水貂只有雄性的皮质优良等，因此可以通过控制性别的途径达到充分利用家畜的目的。家畜性别控制（sex control）是一项能显著提高家畜繁殖效率的生物工程技术，对家畜育种、生产和遗传疾病的防治均有非常重要的意义。随着细胞遗传学、免疫组织化学、分子生物学等学科的迅速发展和精密仪器的研制应用，为性别控制的研究提供了理论依据和先进手段。

分离X精子和Y精子并用于人工授精或显微授精是控制家畜性别最简单、可行的方法。X精子和Y精子分离主要是依据两类精子理化特性的不同而进行的。这方面国外科技工作者进行了多方面研究，发现X精子和Y精子在体积、密度、电荷、运动性和DNA含量、表面抗原等方面存在差异。近年来发展起来的免疫学方法和细胞流式分类器在分离两类精子的效率上显示出较大的优势。应用免疫学方法分离精子在从Eichwald和Silmser（1955）发现雄性特异性弱组织相容性Y抗原（male specific minor histocompatibility-Y antigen，简称H-Y抗原），后逐渐发展起来

的。许多实验都证实,只有 Y 精子才能表达 H-Y 抗原,因而,利用 H-Y 抗体检测精子质膜上存在的 H-Y 抗原,再通过一定的分离程序,就能将精子分离成 H-Y⁺ (Y 精子)和 H-Y⁻ (X 精子)两类。将所需性别的精子进行人工授精,即可获得预期性别的后代。

由天津市奶牛发展中心与华南农业大学共同承担的“奶牛性别控制技术的研究”,贾福德在罗承诺教授的指导下,经反复探索,应用免疫遗传原理筛选出最佳滴度的 H-Y 抗体,与奶牛精子抗原结合产生反应,经荧光染色标记检测,活动被抑制的精子是 Y 染色体精子,未被抑制者是 X 染色体精子。按正常生产操作,将 X 精子冷冻再解冻后评定其活力,平均达到 30% 以上,符合国家规定的冷冻精液质量标准。奶牛性别化精液的研究成功,标志着家畜性别控制技术已由实验室研究迈向生产应用阶段。目前在批量生产性别化精液的同时,已开展奶牛人工输精试配工作,如果性别控制率高,不仅可以加快高产奶牛群或优秀个体的繁殖速度,而且将为奶牛生产创造巨大的经济效益。

体外受精可以为育种工作提供大量的成本低廉的胚胎,可使不同品种雌雄个体的精子和卵子在人工培养条件下实现受精,配合超低温冷冻精液技术的应用,人工授精技术得到了更广泛的应用,使优良种公畜的利用率成千上万倍地增加,还可以用于良种的引进,减少引种费用和疾病的传播。家畜体外受精技术是 20 世纪 80 年代以来出现的一项动物胚胎与细胞工程技术。

早在 1991 年,广西大学动物繁殖研究所就与内蒙古大学实验动物中心共同承担国“863”项目——牛体外受精技术的研究与开发,于 1995 年 7 月成功研究出我国首例试管牛犊,并于该年年底培养出世界上最大的试管牛犊群,数量多达 228 条。该动物繁殖研究所还建立起一套牛体外受精细胞的冷冻保存方法,摸索出水牛卵母细胞的人工激活方法,并初步建立腔前卵母细胞的三维培养系统。自 1998 年起,该动物繁殖研究所又继续进行广泛深入的研究,将体外受精与胚胎移植、性别控制、细胞核移植以及动物转基因等相关技术结合起来,在国内建立了一套高效的牛体外受精程序,各项技术指标均达到国际先进水平。

第四节 植物细胞工程及其在食品工业中的应用

植物细胞工程是细胞工程的一个重要组成部分,主要包括植物细胞培养技术、细胞遗传操作技术和细胞保藏技术。细胞培养技术的研究起步较早,各种培养基的制备及其他很多操作方法已经基本成熟和规范化。植物细胞的遗传操作技术是指采用一定方法对细胞进行遗传改造,它极大地依赖于理论原理、操作技术和设备的发展。例如,基因工程、细胞融合及细胞诱变技术均为细胞工程的研究创造了条件。细胞保藏技术是对培养或改造好的细胞进行适当的保藏,以保持细胞的活力和优良的性状,将其作为研究和生产的材料。通常采用的方法是液氮超低温保藏,人工创造条件使细胞生长代谢活动降低并处于休眠状态,以抑制增殖,减少变异。植物细胞工程的最终目的是利用培养或改造好的细胞生产大量有经济价值的产物,获得人类所需要的生物产品。

一、植物细胞培养及其在食品工业中的应用

植物组织细胞培养的概念源于德国著名植物学家 Haberlandt (1902 年),他提出高等植物的

器官和组织可以不断分割直至单个细胞，而分离出来的每个细胞都有进一步分裂和发育的能力。1904年 Hanning 成功地培养了萝卜和辣根菜的胚，发现离体的胚可以充分发育，并在培养条件下提前萌发形成小苗。我国学者李继侗在 20 世纪 30 年代曾做过银杏离体胚培养并获得成功。1934 年 White 进行番茄离体根的培养，建立了第一个无性繁殖系，为以后各种植物组织培养技术奠定了基础。1950 年，Skoog 和 Tsui 在烟草茎切段和髓培养以及器官形成的研究中，发现腺嘌呤和腺苷可以解除培养基中生长素对芽形成的抑制作用，Miller 等发现了激动素，并证明它可以代替腺嘌呤促进芽的形成。1958 年 Steward 等在胡萝卜细胞悬浮培养中成功地诱导了胚状体，并形成了完整的植株，使植物细胞的全能性首次得到证实。1956 年 Routier 和 Nikell 最早提出应用植物细胞培养技术商品化生产植物化合物的设想，Reinhard 于 1968 年将这一设想变为现实，生产出哈尔碱 (harmine)。通过大规模植物细胞培养可直接生产人类所需植物产品已成为当今植物生物技术领域研究的重要方面。迄今为止，全世界已对近千种植物进行过细胞培养研究，并且采用大规模植物细胞培养生产其代谢产物，这些天然产物包括药品、香料、色素、食品和化妆品等共 500 多种。

(一) 植物细胞培养的技术和方法

1. 植物细胞和组织培养的概念

(1) 植物细胞和组织培养 (plant cell and tissue culture, PCTC)。植物细胞和组织培养是指将植物的器官、组织、细胞或细胞器进行离体、无菌的培养，并重新生成细胞或植株的过程。植物细胞和组织培养又包括下述几种。

① 植物器官培养：包括离体的器官（如根尖、茎尖、叶原基、花器官各部分原基或未成熟的花器官）和果实在适当条件下进行无菌培养，以及从植物的各种器官增殖而形成的愈伤组织的培养。

② 离体胚胎培养：包括成熟或未成熟的胚胎离体培养，通常使用相应的培养基使离体胚正常地萌发生殖，以供研究和操作使用。

③ 植物细胞培养：即植物细胞的体外培养，是指在无菌条件下，将植物细胞从机体内分离出来，在营养培养基上使其生存和生长的过程。利用细胞培养技术可以直接观察到生活细胞的形态和生长活动，并且将植物微生物化，在一定容积的反应器中得到大量的植物细胞。植物细胞培养主要依据是细胞的全能性，即植物体每一个分化的细胞在一定培养条件下具有形成一个完整植株的潜在能力。再生的植物具有与母体植株基本相同的全套遗传信息。

④ 原生质体培养：这是指将植物细胞去除细胞壁形成原生质体后进行培养，它是利用原生质体进行操作的基础。具体方法与细胞培养有相似之处。

(2) 外植体 (explant)。植物组织培养中，作为离体培养材料的器官或组织的片段统称为外植体。

(3) 愈伤组织 (callus)。愈伤组织是由母体外植体组织的增生细胞产生的一团不定型的疏松排列的薄壁细胞。一般愈伤组织培养中没有明显的组织或器官的分化。

(4) 细胞全能性 (cell totipotency)。这是指植物体的每个细胞在离体条件下都具有诱导生长分化形成完整植株的潜在能力，这是由于每个细胞都有一套完整的基因组。细胞全能性是植物细胞和组织培养的主要依据。

(5) 突变体筛选 (mutant selection)。这是指用各种化学的或物理的诱变因素处理组织培养物 (如愈伤组织、悬浮细胞或原生质体和花粉等), 然后在合适条件下将突变体筛选出来。

(6) 体细胞无性系变异 (somaclone variant)。这是指在离体的组织和细胞培养中常出现的变异, 如染色体数的变化或结构的变化。

2. 植物细胞培养的营养要求和特点 植物细胞生长所需营养成分与整个植物对营养的要求一样, 通常包括: 无机盐、碳源、维生素、生长调节剂、氮源、核酸及其水解物和其他成分。应用最广的是 Murashige 和 Skoog 的 MS (1962) 及 Linsmaier 和 Skoog 的 LS 培养基。MS 和 LS 特别适用于植株再生。Gamborg 等的 B₅ 培养基 (1968) 及衍生出来的其他培养基适用于植物细胞及原生质体的培养; E₁ 培养基是 Phillip 和 Colins 为了培养苜蓿植物而改进的 LS 培养基, 特别适合于大豆培养, 还可用于胚胎形成和原生质体的培养; N₆ 培养基是我国朱至清 (1978) 为水稻等禾谷类作物花药培养而设计的。其特点是硝酸盐特别是铵盐浓度较低, 适合于禾本科植物的再培养及禾本科植物的组织培养;

(1) 无机盐。无机盐浓度一般为: 钾 25mmol/L, 铵 2~20mmol/L, 钙、镁和磷 1~3mmol/L。微量元素包括 B、Mn、Zn、Mo、Cu、Co 和 Fe 等。

(2) 碳源和能源。一般以蔗糖和葡萄糖为碳源, 果糖和麦芽糖的利用效果差一些。

(3) 维生素。植物细胞培养需要硫胺素, 如果加入烟酸、吡哆醇、泛酸、生物素和叶酸效果更好。原生质体培养需要大多数必需维生素。

(4) 氮源。一般用硝酸盐作为氮源, 铵盐效果较差, 但铵盐与硝酸盐共用时表现出促进生长的效果。氨基酸一般不单独作为氮源使用, 各种氨基酸的效果依细胞种类的不同有很大差异。例如, 精氨酸、谷氨酰胺、丙氨酸、天冬酰胺有着广泛的促进作用, 天冬酰胺对大豆细胞培养有抑制作用。谷氨酸对甘蔗细胞培养有促进效果, 而谷氨酰胺对其却有抑制作用。

(5) 生长调节剂。经常使用的植物生长素有吲哚乙酸 (IAA)、萘乙酸 (NAA)、2, 4-二氯苯氧乙酸 (2, 4-D) 等, 具有诱导细胞分裂的作用, 使用浓度范围在 0.1~5mg/L。细胞培养中需要的另一类生长调节物质为细胞分裂素, 对芽的诱导有重要作用。细胞分裂素常用的浓度范围为 0.01~1mg/L。主要有激动素 (N⁶-呋喃甲基腺嘌呤)、6-苄基腺嘌呤和玉米素 (N⁶-异戊烯腺嘌呤) 等。

(6) 诱导子。植物在受到外界因子 (如微生物、化学因素和物理因素) 的刺激时, 自身会发生防御反应, 诸如氧化释放 (oxidative burst)、与植物致病有关蛋白的表达、细胞壁增厚及各类植物抗毒素的合成和积累。启动这些防御机制的因子统称为诱导子。诱导子可分为生物诱导子和非生物诱导子两类, 前者指多糖类、多肽类、不饱和脂肪酸类和糖蛋白类, 后者指一些理化因素 (如紫外线、高温、低温、pH、乙烯、重金属盐)。

近年来, 生物诱导子在植物细胞培养生产次生产物的研究中得到广泛应用, 除了纤维素酶、果胶酶、溶菌酶、谷胱甘肽以及来自植物细胞壁的寡糖素外, 应用较多的生物诱导子主要来自真菌, 如真菌孢子、菌丝体匀浆、真菌细胞壁成分、真菌培养物滤液等。在植物细胞培养中, 它们能诱导生物碱、酚类、萜类、皂甙、黄酮类化合物、香豆素、迷迭香酸等多种次生产物的生产, 这种诱导作用的效果与诱导子种类、浓度、接种时期及诱导的时间长短等多种因素密切相关。

3. 植物细胞培养的类型和方法 植物细胞培养的基本程序见图 5-5。植物细胞培养根据不同

的方法可分为不同的类型。按培养对象可分为单倍体细胞培养和原生质体培养；按培养基可分为固体培养和液体培养；按培养方式又可分为悬浮培养和固定化细胞培养。工业化植物细胞培养系统主要有两大类：悬浮细胞培养系统和固定化细胞培养系统。

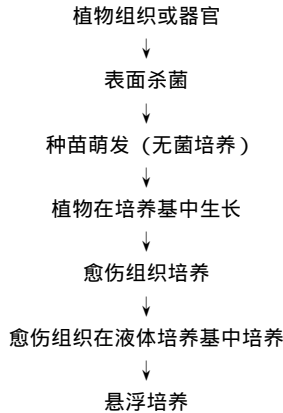


图 5-5 植物细胞培养的基本程序

(1) 植物细胞悬浮培养。悬浮细胞培养是指将组织培养物分离成单细胞，悬浮在液体培养基上进行培养的方法。它是从愈伤组织的液体培养基础上发展起来的一种培养技术。自 20 世纪 50 年代以来，从试管的悬浮培养到大容量的发酵罐培养，从不连续培养到半连续培养和连续培养。目前该项技术已经发展成为以全自动控制的大容积发酵罐进行的大规模工业化生产，能够大量快速地提供比较均匀的细胞，并广泛应用于某些植物有效成分的生产。

① 细胞悬浮培养的要求：

A. 细胞悬浮培养的材料，一般选择疏松易碎的愈伤组织进行起始悬浮培养，在培养的过程中不断进行搅拌和振荡，使愈伤组织上的细胞被剥落到培养液中，得到分散程度高的游离细胞悬浮物。悬浮培养的另一种材料是取自植物的茎部组织或幼胚，在玻璃匀浆器中研磨使软组织破碎，然后利用破碎组织进行液体悬浮振荡培养。在第一代悬浮培养物中，既有单细胞和小细胞团，也有较大的组织残块，所以在以后的继代培养中，要逐渐缩小转移吸管的口径，或将培养物通过一定孔径的筛网，吸取单细胞或小细胞团进行接种。

B. 细胞悬浮培养条件，悬浮培养通常采用水平振荡，可变速率为 $30 \sim 150 \text{ r/min}$ ，振幅 $2 \sim 4 \text{ cm}$ ；温度 $24 \sim 30^\circ\text{C}$ 为宜。气体成分（包括氧气、二氧化碳、乙烯等）对植物悬浮细胞培养的生长和次生代谢物的产量有着重要的影响。植物细胞都是好氧性的，因此在植物细胞培养中需要连续不断地供氧，但是要控制供氧量以保持较低的溶氧水平。大多数植物细胞 pH 为 $5 \sim 7$ ，在此 pH 水平下，通气速率过高会驱除二氧化碳，从而抑制细胞生长。细胞起始密度一般为 $0.5 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^5$ 个 mL 。

C. 剪切力对细胞悬浮培养的影响，植物细胞对剪切力敏感，剪切力对植物细胞的影响有两方面：其积极影响表现为增加通气，保持良好的混合状态和细胞分散性，在适合条件下，尤其在生长后期细胞分泌黏厚的多糖等物质时，对细胞生长繁殖有利，并且提高细胞产率和次生代谢产物产量；但多数情况下则呈现副作用，较高的搅拌速度会造成细胞损伤，引起胞内化合物的释

放,影响细胞形态、代谢和产率及聚集状态等。例如在稍大的搅拌生物反应器中,植物细胞次生代谢物合成能力难以提高,甚至某些时候合成能力丧失,通常认为造成这种现象的一个主要原因是植物细胞的个体大,细胞壁僵硬和具有大的液泡,使其对剪切力敏感。

如果控制适宜的搅拌速度,则可为细胞培养寻找到合适的剪切率。通过研究剪切力对植物悬浮培养的影响,寻求具有剪切力抗性的细胞,将为大型悬浮细胞培养生物反应器的设计提供指导。同时,利用气提式反应器进行植物细胞悬浮培养和对悬浮细胞进行固定化培养是解决此问题的另一途径。

D. 防止细胞凝聚成块,植物细胞很少以单一细胞悬浮生长,具有聚集在一起的特性,它们容易聚集成细胞团,这使得细胞增殖速度变慢,并且影响产物的质量和产量。因此在培养过程中,要选用疏松易分散的起始材料,随时除去细胞团,向培养基中加入 EDTA-Na 螯合剂和果胶酶以防止细胞凝聚成块。

E. 保持细胞培养无菌,植物细胞培养成分复杂而丰富,适合真菌生长,极易造成污染。所以在植物细胞培养系统的准备及培养操作中,保持无菌状态相当重要。植物细胞生长速度慢,操作周期长,间歇操作需要 2~3 周,半连续或连续操作长达 2~3 个月,这就要求相应设备具有较高的质量和稳定性。

② 悬浮细胞培养方法:与微生物相似,植物细胞大规模培养的生物技术由建立细胞株、扩大培养和大罐培养几个步骤组成。建立细胞株包括植物材料的选择、诱发愈伤组织悬浮细胞培养物、筛选优良无性繁殖系、保存和培养细胞系、研究和确定最适生长条件和产量条件。扩大培养是将优良的生产用的细胞株经过几次扩大培养,得到大量的培养细胞,称为种子培养,以作为大规模培养时的接种材料。大罐培养即采用分批的、半连续的和连续的培养系统培养植物细胞。

A. 分批培养法,指在新鲜培养基中加入少量的细胞,在培养过程中既不从培养系统中放出培养液,也不从外界向培养系统中补加培养基的一种培养方法。分批培养的细胞生长一般为 S 曲线(图 5-6)。

在细胞接种到液体培养基中最初时间内细胞很少分裂,经历一个延迟期,然后依次是对数生长期、细胞迅速增殖的直线生长期、停止生长的静止生长期。这种从接种到新鲜培养液中经过延迟期至静止期终了,到达建立一个新的培养的过程,通常称为一个生长周期。分批培养的特点是:细胞生长在固定体积的培养基中,除空气和挥发性代谢物可以同外界交换外,一切都在封闭系统中进行;分批培养结束后,若要进行下一批培养,必须进行另外的继代培养,即只有更换培养液或把细胞转移到新鲜的培养液中才能再次进行生长和分裂;细胞持续倍增的对数

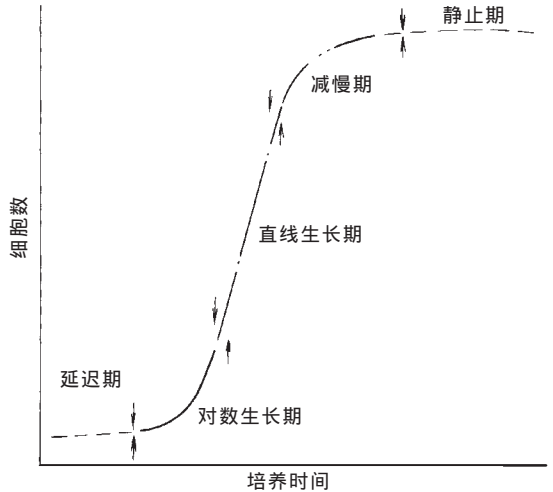


图 5-6 悬浮培养细胞生长曲线
(引自陈峰、姜悦)

期只能保持很短一段时间；细胞的代谢方式、细胞的大小、生理和成分处于不断变化的状态之中。图 5-7 为糖昆布 (*Laminaria saccharina*) 的配子体细胞在循环反应器中悬浮培养的生长曲线。

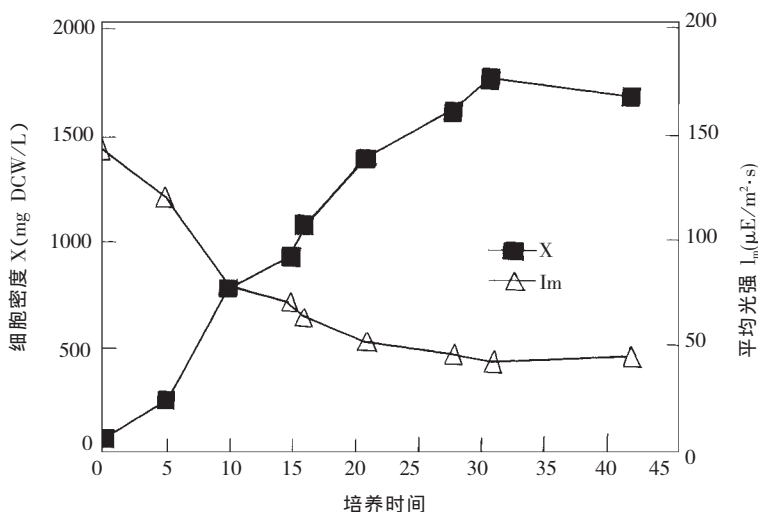


图 5-7 糖昆布的配子体细胞在循环反应器中悬浮培养的生长曲线

(引自 Tong-Jen Fu 等)

分批培养法经过改造形成二段培养法。二段培养法采用两个培养罐，第一罐采用适合于细胞生长的培养基来繁殖细胞，第二罐采用适宜的成分培养细胞以产生有用的代谢产物。

B. 半连续培养法，是指在反应器中投料和接种培养一段时间后，将部分培养液和新鲜培养液进行交换的培养方法。反应过程通常以一定时间间隔进行数次反复操作以达到培养细胞与生产有效物质的目的。此法可以不断补充培养液营养成分，减少接种次数，使培养细胞所处环境与分批培养法一样，随时间而变化。

C. 连续培养法，是指在培养过程中，不断抽取悬浮培养物并注入等量新鲜培养基，使培养物不断得到养分补充并保持其恒定体积的培养方法。连续培养由于不断加入新鲜培养基，保证了氧分的充分供应；在培养期间可使细胞长久地保持在对数生长期，细胞增殖速率快，细胞的生产能力比分批培养高。此外，连续培养适合于大规模工业化生产。连续开放式培养的种类有恒浊培养和恒化培养两种。

恒浊培养是人为地选定一种细胞密度，用混浊度法控制细胞密度，当培养系统中细胞密度超过此限度时，超出部分就会随排除液自动排除，从而保持培养系统中细胞密度的恒定。恒浊培养在一定限度内，细胞增殖速率不受细胞密度和任何培养物质的影响，而取决于环境因子和细胞代谢速度，因此是研究细胞代谢调节的良好培养系统。

恒化培养是以恒定速度随培养液输入对细胞增殖起限制性作用的某种营养物质，使细胞增殖速率和细胞密度保持恒定的培养方法。如果增加或减少这种成分，在一定范围内细胞的生长速率就会相应地增减。恒化培养的主要优点为：细胞可持久地处于稳定状态，细胞的生长、代谢方式和培养液的组成不随时间而改变；可采用限制性养分的浓度和供应的速率来控制培养物的生长速

率，因此有可能确定限制养分对细胞生长的影响。

(2) 植物细胞固定化培养。这是指将细胞、原生质体固定于载体上在固定化反应器中培养细胞的方法。与液体培养细胞相比，其优点在于：固定化细胞生长速度比游离细胞缓慢，有利于次生物质代谢积累，因此在高等植物细胞次生代谢物生产方面具有极大的潜力；细胞位置固定，可建立细胞间的物理、化学梯度，对细胞提供一种接近细胞体内的环境，因此是最贴近自然状态的培养方法；易获得高密度细胞群体、易于控制环境和收获次生代谢产物。

植物细胞固定化的方法有包埋法、吸附法和共价结合法。目前应用较多的载体是海藻酸钙、卡拉胶和琼脂等高分子化合物。海藻酸钙包埋方法比较温和，其固定化作用可以通过加入钙络合剂（如 EDTA 或柠檬酸盐）逆转，同时这种高聚物又能耐受高温灭菌，因此广泛应用于各种类型的细胞固定化。

①大规模海藻酸钙固定化植物细胞方法（图 5-8）：首先进行植物细胞筛选，以直径在 1mm 以下的细小细胞团块进行液体培养通过离心或过滤的方法收集细胞。将湿重的细胞与海藻酸钠按比例混合制成悬液、再注入注射器中，通入无菌空气，以便形成均匀的颗粒。细胞-海藻酸钠悬液通过注射器慢慢滴入盛有氯化钙的培养基中，经磁力搅拌器轻轻搅拌，形成球形颗粒，形成的海藻酸钙颗粒在溶液中保持 30min，以便使钙离子进入球中心，得到固定化细胞。用水充分洗涤颗粒通过过滤收集固定化细胞，然后转入反应器中培养。颗粒大小可用注射器针头大小来控制，一般直径在 2~5mm 范围。

②固定化细胞反应器：固定化细胞反应器有平床式反应器和柱式反应器两种（图 5-9）。

平床式反应器植物细胞固定在聚乙烯泡沫垫上，液体培养基从贮存器中以一定流速滴到泡沫层上起到培养细胞的作用，采用蠕动泵将反应液中培养基吸出并送回到贮存器中，从而可循环使用。为延长细胞生长和存活的时间，要更换新的培养基。柱式反应器保持了平床式反应器的特点，但

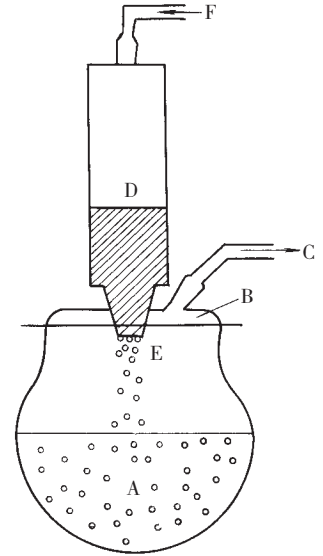


图 5-8 大规模海藻酸钙固定化植物细胞方法
A. 介质容器 B. 盖 C. 空气出口
D. 海藻酸钠胶 E. 细胞出口
F. 无菌空气入口
(引自张自立、俞新大)

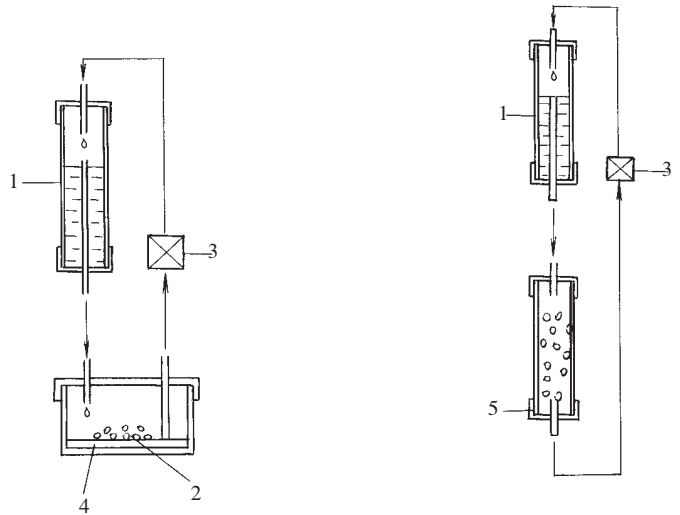


图 5-9 平床式反应器（左）和柱式反应器（右）
1. 培养基贮藏器 2. 泡沫垫 3. 蠕动泵 4. 细胞 5. 固定化细胞
(引自张自立、俞新大)

是它的培养基供给易于控制、并节省空间，特别适合于工业化培养。

(二) 植物细胞培养在食品中的应用

植物次生代谢产物是许多食品成分和抗病药品的重要来源，人们已知的 3 万多种这类天然产物中有 80% 来源于高等植物，如色素、香料、调味品、蛋白酶抑制剂和植物肿瘤抑制剂等 (表 5-2)。近几年这些产品的需求量增长很快，但是由于植物资源有限和气候的变化，使得这些物质的供应受到严重限制。植物细胞和组织培养 (PCTC) 能够对这些产品进行可控制生产，为人类提供恒久的资源。

表 5-2 植物次生代谢物质及其潜在的商业价值

产 物	用 途	来源植物
药物 (化学物质)		
蒽酮 (anthraquinone)	缓泻药、染料	<i>Morinda citrifolia</i>
阿马里新 (ajmalicine)	安定药	<i>Catharanthus roseus</i>
喜树碱 (camptothecine)	抗肿瘤药	<i>Camptotheca acuminata</i>
毛地黄毒苷 (digitoxin)	强心药	<i>Digitalis lanata</i>
薯蓣皂苷元 (diosgenin)	荷尔蒙	<i>Dioscorea deltoidea</i>
人参皂苷 (ginseng saponin)	中药	<i>Panax ginseng</i>
蒂巴因 (thebaine)	可待因	<i>Nicotiana tabacum</i>
泛醌-10 (ubiquinone)	强心药	<i>Catharanthus roseus</i>
长春灭瘟碱 (vinblastine)	抗肿瘤药	<i>Catharanthus roseus</i>
香料 (香味物质)		
香兰素 (vanilla)	香料	<i>Vanilla planifolia</i>
可可 (cacao)	香料	<i>Theobroma cacao</i>
玫瑰油 (rose oil)	香料	<i>Rosa damascena</i>
薄荷醇 (menthol)	香料	<i>Mentha piperita</i>
茉莉 (jasmine)	香料	<i>Jasminum grandiflorus</i>
色素、甜味剂		
花色素苷 (anthocyanin)	色素	<i>Vitis vinifera</i>
紫草宁 (shikonin)	染料	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>
迷迭香酸 (rosmarinic acid)	香料抗氧化剂	<i>Coleus blumei</i>
藏红花 (saffron)	色素/香料	<i>Crocus sativus</i>
索吗甜 (thaumatin)	非营养甜味剂	<i>Thaumatococcus danieli</i>
蛇菊苷 (stevioside)	非营养甜味剂	<i>Stevia rebaudiana</i>

Kaul 等 1969 年曾报道，薯蓣皂苷配基 (diosgenin) 能够由三角叶薯蓣 (*Dioscorea deltoidea*) 的悬浮培养物来生产，产量为干重的 1.5%。1973 年 Furuya 和 Ishii (谷古和石井) 发现有价值的中药人参的细胞培养物可产生大量的人参皂苷，占干重 3%~4%。Ikeda 等 1976 指出用于治疗心脏病的药物泛醌-10 可由烟草细胞悬浮培养物生产，其生产效率高于微生物。此外，有的学者还对其他药物如生物碱、蛋白酶抑制剂、植物病毒抑制剂和生理活性物质的植物细胞培养生产进行过研究。有关食品添加剂的细胞培养合成报道也很多，1973 年 Furuya (古谷) 等从石蕊商陆愈伤组织与培养物中培养分离得到食品着色剂甜菜苷；Mitsuoka 和 Nishi (三冈和西) 1974 年发现日本草木犀 (*Melilotus japonicus*) 的愈伤组织中可累积花色素苷，产量为 2.81mg/kg 细胞干重；Tamaki 等于 1973 年研究证明甘草属的欧亚甘草 (*Glycyrrhiza glabra*)

培养物能合成甘草甜素；Furuya 等在 1973—1974 年发现了利用植物细胞培养获取磷酸二酯酶，并从 RNA 生产 5-核苷酸的方法，许多植物细胞如烟草、胡萝卜和玉米等可用于这一用途。1974 年，Nakamura 等证实了海藻愈伤组织可产生琼脂，包括石花菜 (*Gelidium amansii*)、江蓠 (*Gracilaria confervoides*) 等。Tamaki 等对植物细胞培养法生产烟草进行了研究，他在 1971 年的专利中指出品种为亮黄的烟草愈伤组织在小三角瓶或小发酵罐中进行液体培养，四周后收获 140g 干细胞；Yamaki (玉置) 等 1973 年利用烟草冠缨细胞作为出发材料进行半连续培养，细胞产量为 12~13g/L·d (干重)；Kato 等于 1976 年报道了应用生物反应器进行烟草细胞培养规模已达到 20 000L。

在过去 20 年里，采用植物细胞和组织培养方法生产食品成分已经取得巨大进步，这些成分包括：香料、色素、油料、甜味剂、抗氧化剂等，并且建立起许多大规模细胞悬浮培养体系。例如，Curtiny 1983 年报道在日本已经建立起紫草细胞培养商业化生产体系，紫草细胞培养规模已经达到 750L，所得紫草细胞可作为消炎剂，也可用于提取紫草色素。Sahai 1994 年报道了香兰素等香气成分已经通过细胞培养在 72L 发酵罐中进行生产。1993 年 Kobayashi 等在日本采用 500L 发酵罐对花色素苷进行了大规模细胞悬浮培养生产。据 Ushiyama 1996 年报道，国际上通过植物细胞和组织培养的方法进行食品成分商业化生产最成功者是日本，他们利用人参细胞悬浮培养获得的人参产品已作为添加剂用于酒和饮料，日本 Nitto Denko 公司自 1990 年开始生产药酒，1995 年市场销售额为 300 亿美元。近几年，利用生物合成方法生产植物次生代谢物已在高产量、高密度、细胞悬浮培养及大规模生物反应器的设计和操作等方面已经取得重大进展。包括有关植物细胞和组织培养产品的商业化应用和安全性以及管理问题也受到世界各国的关注，植物细胞和组织培养食品成分的安全性评估方案已形成，许多国家完成了植物细胞和组织培养食品成分管理框架图。

1. 紫杉醇 (taxol) 的生产 红豆杉又称紫杉、赤柏松，是世界上濒临灭绝的珍稀树种，至今已有 250 万年的历史。它的根、茎、叶、皮及种子含有具有抗癌活性的二萜烯类化合物——紫杉醇，其中太平洋紫杉的皮中含量最高。美国、英国、俄罗斯、韩国和我国对其进行了多年的研究，将紫杉醇从紫杉中提取出来，用于临床治疗癌症。经临床研究证明：紫杉醇对男性的睾丸癌、女性的乳腺癌和卵巢癌、肺癌和黑色素细胞瘤等肿瘤均有疗效，因此被专家和学者认为是当今国际上最有前途的抗癌药物，现已被 50 多个国家批准作为药物使用。目前，临床上使用的紫杉醇主要来源于红豆杉科的红豆杉属，在我国黑龙江已经建立了世界上第一片人工无性繁殖红豆杉林，经检测人工无性培育红豆杉树苗，其紫杉醇的含量相当于百年老树中紫杉醇的含量。但是红豆杉生长缓慢，紫杉醇的含量很低，因此依靠种植红豆杉获取紫杉醇很难满足临床和基础研究的需要。为了解决红豆杉资源的短缺并且保证该药的长期供应，目前国内外普遍采用植物组织细胞培养法生产紫杉醇。与合成法、栽培法等相比较，细胞培养法具有许多优点：可以在生物反应器中大规模培养，并通过控制培养条件诱导出大量的紫杉醇；确保产物连续生产，不受环境因素的限制；所得产物可以从植物体内直接提取，简化了分离和纯化的步骤。因此，细胞培养法已经成为紫杉醇商业化生产优选的方法。

(1) 红豆杉细胞培养生产紫杉醇的一般步骤。细胞培养法生产紫杉醇的一般步骤为：诱导愈伤组织→继代培养→建立悬浮培养→扩大培养。

①愈伤组织的诱导：红豆杉为木本裸子植物，诱导愈伤组织比较困难，不同种属的红豆杉、不同的器官组织以及生长部位、外植体内紫杉醇含量均不相等，因而对应的诱导愈伤组织的培养基及其培养条件也不相同。一般而言，以幼茎、形成层或树皮诱导愈伤组织的效果好，诱导率也高。其他部位的外植体诱导能力较差或根本诱导不到愈伤组织。蔡朝晖等报道了以东北红豆杉幼嫩的茎、叶和芽的愈伤组织的诱导、生长等情况，结果表明：叶为外植体时，产生愈伤组织的速度较快；以芽为外植体诱导率较高，达 100%。采用 B₅、SH 和 7-V 等培养基时诱导率较高。碳源以蔗糖为主，浓度在 1.0~3.0%，当含有 1.0%~2.0% 的 2, 4-D 时，对愈伤组织的诱导极为有利。

②愈伤组织的继代培养：愈伤组织需要经过较长时间的多次继代培养，变得比较疏松时，才能进行悬浮培养。继代培养过程与细胞的生长情况、外植体的来源、培养基及培养条件密切相关。Fett-Neto 等用东北红豆杉的各组织作为外植体诱导出愈伤组织，发现幼茎和针叶所得的细胞生长情况最好。Gibson 在研究短叶红豆杉细胞时发现，在诱导培养基上，经过 1~3 个月才开始形成的愈伤组织继代培养存活率最高。多数报道认为：愈伤组织继代培养最适的培养基为基本的或改良的 B₅ 培养基，少数适用的还有 SH 等，其他培养基对维持愈伤组织的正常生长效果均不是很好。通常在培养基中添加高含量的 NH₄NO₃ 可明显提高培养细胞的生长速率，培养基中适量的 NAA 和 2, 4-D 或含有该激素的组合对愈伤组织的正常生长是必需的。碳源一般选用蔗糖，培养温度 20~25℃ 最适合于红豆杉愈伤组织的培养。红豆杉属细胞在生长过程中会分泌一些不利于生长的酚类物质，导致组织褐化、细胞死亡，在培养过程中添加一些还原剂或酚类吸收剂可以部分解决这一问题。

③悬浮细胞培养：自 Christen 等在 1991 年获得红豆杉细胞培养的第一个专利以来，已有 9 种红豆杉植物建立了细胞悬浮培养系统，培养技术的研究取得了很大的进展。有研究认为选择紫杉醇含量高的外植体（如针叶或分生组织）可以获得高产细胞系。一般用于愈伤组织及继代培养的基础培养基也可用于悬浮培养，目前主要使用 B₅ 培养基，使用的碳源大多为蔗糖，果糖对于提高紫杉醇含量有一定作用。植物激素对悬浮细胞的培养和紫杉醇含量有较大的影响，当生长素和激动素比例为 5~10 时，紫杉醇含量较高。有机添加剂（如酪蛋白水解物）不仅能促进细胞生长，还能促进紫杉醇的含量。研究证明：接种量不应低于 70g (FW) /L，当接种量低于 50 g (FW) /L 时细胞生长停止。悬浮细胞培养适宜的气体组合为：10% 氧气、0.5% 二氧化碳、及 5mg /kg 的乙烯。张姝等研究分析了超声波对中国红豆杉悬浮细胞培养的生长、紫杉醇合成及释放的影响。细胞对不同强度及作用时间的超声波反应不同。用 38kHz, 120s 的超声强度处理悬浮细胞，紫杉醇胞外释放率由对照的 10% 左右提高到 40%~50%，总产量提高了 47%。

④提高紫杉醇产量的方法：首先应该选择紫杉醇含量高的外植体作为诱导材料，以获得高产细胞株系；其次，在培养基中加入诱导子可提高紫杉醇的含量，同时促进产物分泌到培养基中。元英进、Ceddi 等、Yukimune 和林岚等研究证明真菌、花生四烯酸、茉莉酸甲酯以及植酸等均可作为红豆杉细胞培养过程中有效的诱导子增加红豆杉的产量。梅兴国等的研究表明，水杨酸 (SA) 可提高 POD 及 PAL 的活性，并且有利于紫杉醇的合成，其中 20mg /L SA 对紫杉醇合成的促进效果最明显。黄浩的研究发现添加 0.1% 活性炭 (AC)、0.01% 植酸 (PA) 及高浓度的 V_C 对红豆杉细胞生长有促进作用。陈正山等在改良的 B₅ 培养基中加入不同浓度的聚乙二醇对东

北红豆杉培养细胞进行摇瓶培养时，发现聚乙二醇对细胞的生长及紫杉醇生产均有明显的促进作用。化学物质如水银、重金属、矾酸盐和人工合成物苯甲酸等非生物诱导子的协同加入，同样能够提高次生代谢物的产量。元英进研究证明了在细胞生长的对数期加入稀土化合物能显著提高东北红豆杉细胞合成与释放紫杉醇的量。Srinivasan 等、元英进、Stierle 和孙彬贤等研究表明，在培养基中加入苯丙氨酸、醋酸钠、异亮氨酸、乙酸盐及牛儿醇等前体物质，均可以提高紫杉醇的含量。

(2) 红豆杉细胞培养生产紫杉醇研究实例。1999 年 Minoru Seki 和 Shintaro Furusaki 等学者对细胞培养法生产紫杉醇进行了报道。他们采用了灌注式培养 (perfusion culture) 的同时从培养基中回收紫杉醇的连续生产体系，生产率随着灌注式培养稀释率的增加而提高。其主要研究内容如下。

① 细胞组织种类：采用日本紫杉树 (*Taxus cuspidata*)、太平洋紫杉树 (*Taxus brevifolia*) 和欧洲紫杉树 (*Taxus baccata*) 的幼茎或茎尖进行愈伤组织培养。将样品浸没在乙醇和次氯酸盐溶液中消毒，切成 5mm 长的外植体，然后接入琼脂培养基培养。

② 培养基和培养条件：以 Gamborg's B₅ 培养基为基础，减少硝酸钾浓度，去除硫酸铵，补充蔗糖、酪蛋白氨基酸、萘乙酸 (NAA) 和激动素等成分。愈伤组织在装有 100mL 液体培养基的 300mL 三角瓶或圆锥烧瓶中进行悬浮震荡培养。震荡速度为 100r/min。

③ 灌注培养紫杉醇连续生产：使用三角瓶或圆锥烧瓶，在 100r/min 下灌注培养。新鲜培养基通过蠕动泵连续注入到反应瓶中，反应瓶中的培养基被泵出并通过带有尼龙筛网的细胞分离器，以保持培养体积不变。

源于幼茎或茎尖的愈伤组织由 0.5g/m³ 萘乙酸和 0.2/m³ 激动素诱导 3 个月后，转移到含有 2g/m³ 萘乙酸的培养基培养。

诱导的紫杉醇细胞不断向培养基中分泌紫杉醇，经过 11d 培养，累积量达到 0.38mg。产率为 0.3mg / (g (细胞干重) · d)。结果还表明，随不断将分泌产物从培养基中移，产率相应增加。

为了提高总产率，一个很重要的方法就是增加培养基的稀释率，使得培养基在紫杉醇移走之后得以再利用。为此，Minoru Seki 等提出了一个新的紫杉醇连续生产体系见图 5-10。

这个系统由两个亚系统构成，一个是固定化紫杉醇细胞的生产系统；另一是采用抽提或吸附

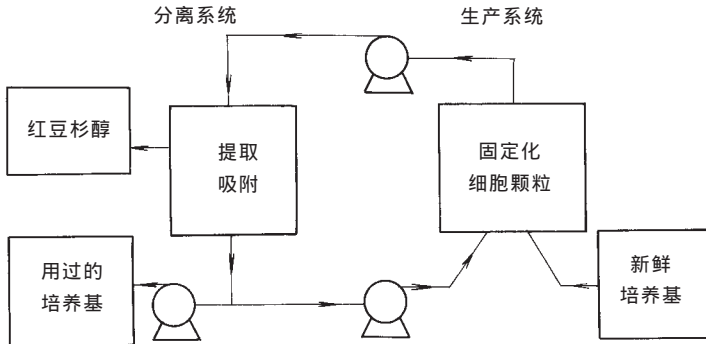


图 5-10 培养基循环连续生产体系

法进行紫杉醇转移的分离系统。

④固定化培养：通过海藻酸钾对 *T. cuspidata* 细胞固定化，凝胶颗粒直径大约 5mm。无论是进行批式培养，还是灌注培养，在较高的稀释率下，悬浮细胞培养和固定化细胞培养的生成浓度几乎一致。应用固定化 *T. cuspidata* 细胞灌注培养进行长期连续生产紫杉醇可以持续 40 d。

⑤不同树种紫杉醇产率的比较：在 3 个树种固定化细胞灌注培养过程中，经检测，紫杉醇连续地释放到培养基中。图 5-11 表明了三个树种紫杉醇产率和灌注培养稀释率的关系，当稀释率高至 $5d^{-1}$ 时，*T. cuspidata* 细胞紫杉醇产率可达到 $1.8\text{mg}/(\text{gDCW}\cdot\text{d})$ ，但是它的愈伤组织生长比其他两种慢得多。

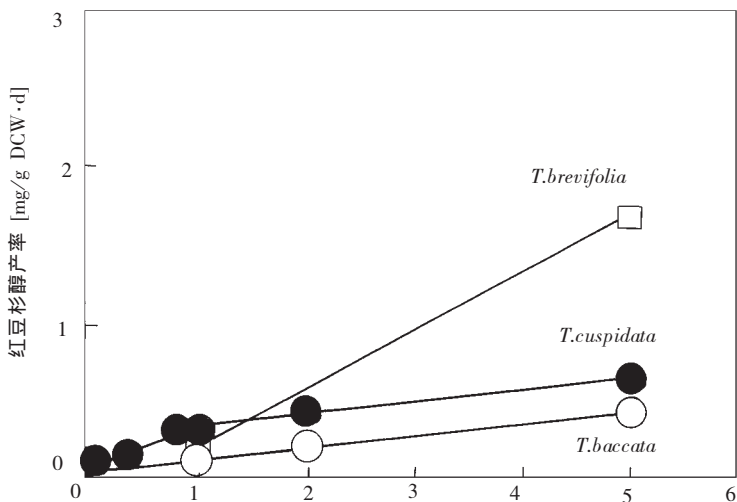


图 5-11 三树种紫杉醇产率和灌注培养稀释率的关系

(引自 Tong-Jen Fu 等)

2. 迷迭香酸 (rosmarinic acid, RA) 的生产 迷迭香酸是一种酚类化合物，存在于很多药用植物和调料中，具有抗菌、抗病毒、抗氧化和抗炎等生物活性，因此可以用于医药和食品保藏。RA 毒性很低， LD_{50} 为 $561\text{mg}/\text{kg}$ ，是一种低毒、无异味的天然食品抗氧化剂。RA 在植物中含量很高，高达植物干重的 7% 左右，但是采用生物细胞培养的方法生产 RA 更为有效。当采用含高浓度蔗糖培养基进行培养时，可使培养的植物细胞积累 RA 至细胞干重的 20%。Maike Petersen 对细胞培养方法生产 RA 进行了综述。

(1) *Anchusa officinalis* 细胞培养。采用 *Anchusa officinalis* 细胞经过优化改良的 B_5 培养基悬浮培养，RA 含量可达到细胞干重 12.3%。研究认为，培养基最适蔗糖含量为 3%。其他糖如果糖、葡萄糖或两者混合使用均逊于蔗糖。矿质离子对 RA 产率没有促进作用，可是荷尔蒙对 RA 积累有持续的影响，2, 4-D 对 RA 的形成有阻碍作用，这种作用随萘乙酸的应用而增强。Su 等对此进一步的研究表明，采用灌注技术对细胞进行连续培养，能够获得更高的 RA 产量。

(2) *Salvia officinalis* 细胞培养。Hippolyted 等通过悬浮细胞培养技术使 *Salvia officinalis* 细胞 RA 最高干重得率为 36%。与 *Anchusa officinalis* 细胞培养相比，培养基中蔗糖浓度极大地

影响 RA 积累。当采用蔗糖含量为 3% 的 MS 培养基时, 仅能产生 RA 0.6g/L; 而当蔗糖含量为 5% 时, RA 产量达 3.5g/L, 相当于干重得率 19%。此外, 生物合成前体苯丙氨酸的应用能够缩短 RA 生产周期, 提高 RA 含量。5% 蔗糖和 0.1g/L 丙氨酸组合可获得 RA 6.4g/L, 相当于干重得率 31%。而当蔗糖 5%、2,4-D 和生长素均为 0.5mg/L, RA 的干重得率最高, 为 36% 或 6.4g/L。

(3) *Coleus blumei* 细胞培养。第一个 RA 细胞培养生产体系的建立源于 *Coleus blumei*。Zenk 和 Coworkens 等 1977 年研究证明, 当蔗糖含量为 3% 和 7% 时, RA 干重得率分别达到 11% 和 5%, 不同糖的种类和浓度对 RA 积累影响及 RA 达到最高量的培养周期见表 5-3。1985 年, Ulbrich 等首先报道了 *Coleus blumei* 细胞悬浮培养大规模生产 RA 的方法, 随后两段式操作建立起来。它包括采用 B₅ 培养基进行细胞繁殖的细胞生长阶段和由 5% 蔗糖溶液组成的培养基进行的产物积累阶段两部分 (表 5-4)。大规模生产在两个各具有 32L 体积的反应器中进行, 细胞生长阶段在气升式反应器中进行, 共培养 8d; 然后将培养物的 30%~50% 转移到装有 5% 蔗糖溶液培养基的搅拌罐反应器中, 在此条件下细胞生长受到限制并开始产生 RA, 经过 14d 积累, 可获得最高产量 RA 5.5g/L 或干重得率 21%。

表 5-3 不同糖的种类和浓度对 RA 积累的影响及 RA 达到最高量的培养周期

培养基中的糖	最高 RA 含量 (% , 干重)	培养周期 (d)
4% 蔗糖	8.5	10
4% 葡萄糖	7.5	10
4% 果糖	3.5	12
2% 葡萄糖 + 2% 果糖	5.3	12

表 5-4 *Coleus blumei* 大规模细胞悬浮培养

	细胞量 DW (g/L)	RA (g/L 培养基)	RA/DW (%)	RA 产率 (mg/L·d)
生长培养基	4.7	0.15	2.9	20
生产培养基	21.3	2.24	15.0	266
两段式生产	25.7	5.5	21.4	910

3. 微藻细胞培养方法 微藻 (microalgae) 种类约占藻类总量的 70%, 即 2 万多种, 其中一些营养丰富, 因此具有广阔的应用前景。德国、美国、澳大利亚和日本等国从 20 世纪 40 年代至 70 年代, 对微藻的商业化培养及光合反应器进行了大量的研究, 用于生产可作燃料的类脂和藻类单细胞蛋白等。80 年代末, 许多国家包括我国采用生物技术手段工业化生产微藻, 并且从藻细胞中提取某些从其他生物中难以得到的成分, 如 n-3 多不饱和脂肪酸、虾青素和其他生物活性物质, 以作为食品或药品的重要资源。目前我国已有近百家微藻生产厂家。以下是与食品工业密切相关的几种微藻的细胞培养方法。

(1) 螺旋藻 (*Spirulina*)。螺旋藻含有极丰富的优质蛋白、人体所需的全部必需氨基酸、β-胡萝卜素、可吸收铁、维生素 B₁₂ 以及 γ-亚麻酸等营养成分, 营养成分配比合理, 具有重要的医药价值。如 γ-亚麻酸有助于治疗心脏病和癌症; 螺旋藻多糖与糖蛋白具有抗辐射、抗氧化和提高肌体免疫力的作用。目前中国已成为螺旋藻生产大国, 年产量达 1 000t。

① 螺旋藻的培养条件: 螺旋藻在黑暗条件下不能利用有机碳源, 但在光照条件下可以利用碳

水化合物,具有一定异养能力。在其生长培养基中添加 $0.1\text{g}/100\text{mL}$ 的葡萄糖,可以提高螺旋藻的生长率和细胞产量。采用 NaNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或尿素作氮源时,螺旋藻产量为 $25.0\text{mg}/\text{mL}$,而不加氮源时仅为 $2.61\text{mg}/\text{mL}$ 。 Na^+ 和 K^+ 都是螺旋藻生长所必需的元素;此外,磷酸盐、 N/P 比和微量元素对螺旋藻的生长均有一定影响。螺旋藻生长的最适 pH 为 $8.5\sim 10.5$,最适温度为 $28\sim 35^\circ\text{C}$,最适生长光照为 $30\sim 35\text{klx}$ 。

②螺旋藻的培养系统:螺旋藻培养系统大致可分为水平池培养系统和封闭式光生物反应器两大类,后者包括外部光源和内部光源两种。目前国外开发的外部光源封闭式光生物反应器大部分尚处于中试规模,体积达 10m^3 ,面积几百平方米。1996 年意大利建成了一个 20L 的封闭式光生物反应器,用来生产螺旋藻,其产量达 $20\text{g}/\text{m}^2\cdot\text{d}$ 。我国华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室,已经研制出一台 10L 简易封闭式光生物反应器,培养螺旋藻平均生产率达 $22.6\text{g}/\text{m}^2\cdot\text{d}$ 。

G.L.Rorrer 采用 3L 外部光源搅拌生物反应器系统 (stirred tank bioreactor) (图 5-12) 和 3L 管道式循环生物反应器 (tubular bioreactor with recycle) (图 5-13) 进行螺旋藻细胞悬浮培养研究。图 5-12 是一个台式 3L 夹层发酵罐,装备有外部光源和制冷循环系统。

循环反应器系统由各主要部分组成: 2L 生物线圈部分、与线圈相连接的气升注射器、 2L 通风培养罐、蠕动泵、光源部分。线圈部分由硅树脂管缠绕在六边形框架上构成,管壁透明透光,与线圈相连接的气升注射器并不是用于通风培养,而是在周期间隔期间通气,使得培养物以恒定

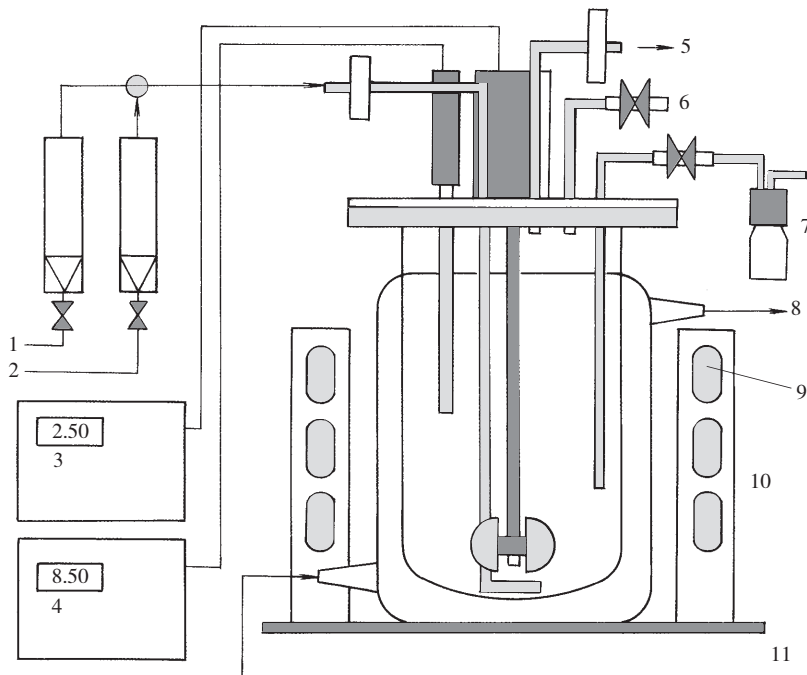


图 5-12 3L 外部光源搅拌生物反应器

1. CO_2 2. 空气或 N_2 3. 搅拌器控制 4. pH 计 5. 空气出口 6. 培养基或碳酸氢盐入口
7. 样品瓶 8. 制冷循环器 9. 9W 灯 10. 荧光灯管 11. 光源

(引自 Tong-Jen Fu 等)

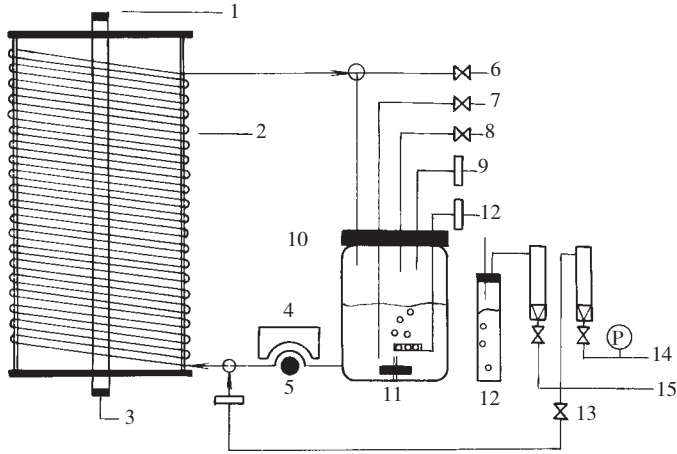


图 5-13 3L 管道式循环生物反应器

1. 20W 荧光灯 2. 生物线圈 3. 定时器 4. 蠕动泵 5. 气升式注射器 6. 产物
7. 样品 8. 培养基入口 9. 空气出口 10. 通风培养罐 11. 磁力搅拌器
12. 吸湿剂 13. 定时器 14. 压缩空气罐 15. 空气泵
(引自 Tong-Jen Fu 等)

速度通过管路，并将黏附在管壁上的生物量震荡下来。

(2) 小球藻 (*Chlorella*)。小球藻含有丰富的蛋白质、氨基酸、脂类、碳水化合物、 β -胡萝卜素等有价值的化合物，目前有关通过小球藻细胞培养生产 β -胡萝卜素的研究开展得很多。

① 小球藻的培养条件：在现代发酵罐系统中进行微藻的异养培养时，选择的最适生长温度通常为 24~30℃，最适 pH6.0~7.0。藻细胞生长要达到较高的浓度，必须供给足够的溶解氧，因此可采用通气和搅拌方式向培养体提供溶解氧。

② 小球藻的培养系统：小球藻工业化生产细胞培养系统主要有封闭式光照反应器和异养培养系统等。其中异养培养系统不需要光照，发酵罐、管道系统和培养基容易灭菌，培养条件易于控制。微生物异养培养系统中的分批培养技术、连续培养技术等均可用于微藻的异养培养，并可大大提高单位体积培养液中微藻的细胞浓度。

(3) 杜氏藻。与螺旋藻和小球藻不同，培养杜氏藻的目的不在于获取大量的生物量，而在于获得 β -胡萝卜素。高盐、低氮和强光照有利于杜氏藻累积 β -胡萝卜素，但不利于其生长。因此在生产中可采用二段培养法，即先用低盐条件使藻增殖至较理想程度，再提高盐浓度使藻累积 β -胡萝卜素。另一种较为理想的生产方式是，在藻生长和 β -胡萝卜素均处于亚适宜条件下进行连续培养或分批培养，这样可在同等时间内获得相对高的 β -胡萝卜素产率。

4. 黄酮类化合物的生产 黄酮类化合物是一种小分子的酚类物质，广泛存在于植物界，具有多种生物功能，如调节植物生长、保护植物免受紫外线损伤、具有抗癌活性、作为植物的抗菌毒素等。黄酮类化合物含多种中药材的主要成分，已经从植物组织及其培养物中发现的黄酮类化合物有几千种之多。研究表明，各种培养条件对植物细胞合成黄酮类化合物的影响主要有以下几方面。

(1) 碳源影响。据 Ramakawa T. 等报道，蔗糖最有利于植物组织培养物的生长和黄酮类化合物的合成，葡萄糖其次。蔗糖浓度高于 2%~3% 时会刺激黄酮类化合物的合成。Zhao De Xiu

等的研究表明,当蔗糖浓度从2%增加到5%时,雪莲(*Saussurea medusa*)细胞黄酮类化合物总产量有所提高。也有研究认为,提高蔗糖浓度会抑制细胞生长和次生代谢物的合成,如CalleHaut A.于1993年发现在6%蔗糖浓度下,悬浮培养的筋骨草(*Ajuga reptans*)细胞生长非常缓慢,花色素苷总产量下降。

(2) 氮源影响。通常降低培养基中氮源总浓度可促进黄酮类化合物的合成。以 NO_3^- 为惟一氮源有利于悬浮培养玫瑰茄(*Hibiscus sabdariffa*)细胞的生长, NO_3^- 最适浓度为 80 mmol/L ,随着 NH_4^+ 浓度提高,细胞生长速度下降,但是次级代谢物合成能力有所提高。

(3) 植物激素的影响。悬浮培养淫羊藿细胞合成黄酮类化合物需要2,4-D,最适浓度为 10^{-5} mmol/L 。据Zhao De Xiu等的研究,IAA和NAA不适宜细胞生长和产物的合成,雪莲培养物生长和黄酮类化合物的合成以NAA和BA组合最好,当NAA和BA浓度分别为 2 mg/L 和 5 mg/L 时,细胞生长量和黄酮化合物合成达到最大。

(4) 剪切力的影响。在细胞大量培养时,通气和搅拌产生的剪切力对植物细胞的生长和黄酮类化合物的合成有很大影响,如搅拌浆叶片的尖端速度超过 8 m/s 时,白苏(*Perilla frutescens*)细胞就会受到严重伤害,细胞生长量和花色素苷的合成都会受到抑制。

(5) 光照条件的影响。光照可以促进植物细胞黄酮类化合物的合成,在光照条件下,雪莲细胞黄酮类化合物的合成量是暗培养的4倍。紫外线可引发植物合成黄酮类化合物基因的转录活性,经紫外照射后,黄酮类化合物迅速合成并积累于表皮细胞中。

(6) 高产细胞系的筛选。愈伤组织高产系在进入悬浮培养后可能会丢失其合成黄酮类化合物的能力,需要不断筛选以得到稳定的高产细胞系。Hiraoka和Mizukami分别得到了在暗培养下,合成黄酮类化合物的柴胡(*Bupleurum falcatum*)细胞系和玫瑰茄细胞系。

二、其他植物细胞工程技术及其在食品工业中的应用

(一) 植物原生质体融合

1. 植物原生质体融合的涵义 植物原生质体融合也称体细胞杂交,原生质体融合的结果能使细胞内遗传物质重新组合,这样获得的细胞叫杂种细胞。原生质体融合过程,先进行细胞分离、原生质体制备、原生质体融合、杂种细胞筛选及其培养,然后再通过愈伤组织诱导分化出根、茎、叶,最后长成完整的体细胞杂种植株。

通过植物原生质体融合得到的体细胞杂种存在两个突出的特点:①体细胞杂种与有性杂交得到的某些杂种一样,它们的许多形态学上的特征是介于两亲本之间的,如叶片大小和形状、叶表毛状体密度、叶柄大小、花的形状、花的大小和颜色以及种子的形态、结构等,几乎所有的由多基因控制的性状均是介于双亲之间的。②在再生的体细胞杂种植株的群体中,各种性状均有很大的变异性,而且在不少情况下,其总的变异幅度可以超过有性杂种的后代。不同的杂种植株中,以下的各种性状可能产生很大的差别:植株高度、成熟期、叶片形态和大小、叶柄长度、花色、花长度、可杂交性、同工酶谱带特征、花粉的可育性等。

2. 植物原生质体融合技术的应用 植物原生质体融合技术在植物育种上有重大的应用价值,它打破了常规有性杂交育种的不亲和性障碍,为实现超远缘杂交提供了可能。现在,通过原生质

体融合已获得了不少体细胞杂种（表 5-5）。

表 5-5 原生质体融合的属间杂种植物

原生质体融合亲本	研究者
马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>) × 番茄 (<i>Lycopersicum</i>)	Melcher 等 (1978)
拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>) × 油菜 (<i>Brassica campestris</i>)	Gleba 等 (1979)
胡萝卜 (<i>Daucus carota</i>) × 羊角芹 (<i>Aegopodium podagraria</i>)	Dudits 等 (1979)
胡萝卜 (<i>Daucus carota</i>) × 欧芹 (<i>Petroselinum hortense</i>)	Dudits 等 (1979)
矮牵牛 (<i>Petunia hybrida</i>) × 烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	李向辉等 (1981)
矮牵牛 (<i>Petunia</i>) × 番茄 (<i>Lycopersicum</i>)	Tabaeizadeh (1983)

在这些杂种中，大多是用常规有性杂交方法所不能获得的组合，但是用细胞融合方法却获得了成功。说明体细胞杂交可以克服有性杂交不亲和性的障碍，产生更广泛的遗传重组。马铃薯和番茄 (Melcher 等, 1978) 的杂种是体细胞杂交模型的首次实现，马铃薯番茄的外形倾向于番茄植株，而花和叶具有杂种的特点，并结有畸形的小果实，但根部没有形成薯块。

中国科学院遗传研究所、中国科学院植物研究所等单位 1973 年以来，从原生质体培养获得的再生植株种类有烟草、胡萝卜、曼陀罗、油菜甘蓝等，由原生质体再生出愈伤组织的种类有水稻、甘蔗、绿豆、豇豆、扁豆、大豆、猕猴桃等，其中水稻、甘蔗、龙胆已有器官分化。在原生质体融合方面，从烟瘤 B₆S₃ 和矮牵牛 W₄₃ (李向辉等, 1981) 原生质体融合得到属间体细胞杂种植株，其幼苗形态倾向于矮牵牛。兰州大学研究得到的烟草和天仙子体细胞杂交植株，为国际上较早获得远源属间体细胞杂种植物的第五例。

胡琼等采用 PEG 融合方法进行了甘蓝型油菜和新疆野生油菜叶肉原生质体的融合，并获得 54 株融合杂种。自交种子的主要脂肪酸含量分布偏向于一个融合亲本，油酸和亚油酸含量偏向于低亲，而亚麻酸和芥酸含量偏向高亲。胡琼等还将甘蓝型油菜和诸葛菜的叶肉原生质体进行融合，其主要脂肪酸组份含量接近于甘蓝型油菜亲本。孟金陵和田志宏等采用电融合和 PEG 融合方法进行了 *Moricandia niens* (属于十字花科) 的叶肉原生质体与甘蓝 (花茎甘蓝、卷心菜等)、白菜和甘蓝型油菜的下胚轴原生质体的融合，每一融合组合均产生了融合体。分子标记分析表明，86% 以上的植株是真杂种。Muller 等使用融合仪进行了甘蓝型油菜与亚麻芥 (*Camelina sativa*) 和山芥 (*Barbarea verna*) 的原生质体融合的研究。

(二) 植物细胞器的分离和移植

植物细胞器移植是指从不同植物细胞中分离得到细胞器 (如叶绿体和线粒体等)，再将其导入受体原生质体中的过程。叶绿体是植物进行光合作用的场所，如果能把高光合效率作物的叶绿体移植到低光合效率作物中，就可能提高低光合效率作物的光合效率，从而达到增产的目的。线粒体的移植可以传递部分遗传信息，从而改变受体细胞的某些特征，如抗药性和雄性不育性等。利用细胞器移植的方法，能够克服远缘植物细胞原生质体融合的不亲和性，在研究核基因组、质体系统和线粒体系统之间的相互作用等方面，要比体细胞杂交容易和便于遗传分析。

1. 细胞器移植的基本原理 植物原生质体摄取细胞器的机理主要有 3 种：①通过内吞作用摄入，细胞器附着在原生质体膜上，接着细胞内陷，膜包裹的细胞器释放到细胞质中。②通过融合作用摄入，细胞器内含物游离释放到细胞质中。③用脂质体包装细胞器并通过融合作用摄入，脂质体起到保护细胞器的作用。

2. 细胞器移植的方法

(1) 细胞器分离的方法。叶绿体的分离有两种方法，其一为机械法，在机械法中，一般要求选择质地柔软易于匀浆的材料，经过研磨、过滤和离心搜集叶绿体。其二是从植物原生质体中分离叶绿体的方法，该法包括原生质体的制备和叶绿体的分离两个主要过程。首先将植物材料进行酶解处理获取原生质体，原生质体经分离纯化，再以温和的破膜方法分离完整的叶绿体。植物细胞核分离的方法与叶绿体相类似。

(2) 摄入细胞器的方法。最早使用夹层离心法，将分离的原生质体低速离心沉于管底，采用同样方法将分离得到的细胞器铺于原生质体层上面，如此反复离心多次，导致细胞器摄入。PEG 诱导是一个重要的方法，通过融合剂的促融作用引起细胞器和原生质体膜紧密相连并融合，接着细胞器的内含物释放到原生质体中。

3. 细胞器移植研究概况

(1) 叶绿体移植。叶绿体移植具有重要的意义，它有助于进一步弄清叶绿体的发育生物学以及核和叶绿体 DNA 怎样控制叶绿体的发生，有可能用于植物光合作用效能的改良。Potyrkus 1973 年将正常的矮牵牛叶绿体转移到白化突变体的叶原生质体中，发现在 0.1% ~ 0.5% 原生质体中有 1~20 个正常叶绿体。同年 Carlson 将白化突变的烟草原生质体与野生型叶绿体共培养，结果叶绿体被摄进白化的原生质体中，得到再生的花斑绿色植株。这表明叶绿体在受体细胞质中行使了正常的复制功能和生物学功能。

(2) 细胞核移植。核移植是植物基因转移、整合和表达的有效方法。1978 年 Saxena 等采用一稳定的泛酸缺陷型细胞系南洋金花 (*Datura innoxia*) 原生质体为受体，采用 PEG 法对从豆科植物 *Vicia hajastana* 分离的核诱导摄入。将处理过的原生质体首先在 MS⁺ 泛酸培养基上培养，以促进细胞启动分裂；然后在无泛酸的培养基上稀释培养；最后在 MS 培养基上培养选择原养型愈伤组织，并得到再生的小植物。用 DNA 点杂交方法证明在南洋金花原养型细胞中存在外源 *Vicia* 的核 DNA。线粒体有自己的遗传基因，能够合成一些蛋白质。线粒体移植方法较多，有微注射、载体转移以及胞饮摄入法等多种方法。

(三) 单倍体育种

单倍体培养是指利用花药在人工培养基上进行培养，从小孢子（雄性生殖细胞）直接发育成胚状体，长成单倍体植株；或者通过愈伤组织诱导分化出芽和根最终长成单倍体植株；所得单倍体植株再经染色体加倍形成正常的二倍体，进而的从中选出优良个体培育成新品种的育种方法。

单倍体细胞培养已经在植物育种中取得了很大的成就。1964 年 Guha 和 Maheshwari 利用曼陀罗花药首先培育出花粉单倍体植株，此后花药培养和小孢子培养相继在烟草、水稻、小麦、玉米和油菜等农作物上获得成功。至 1992 年花药培养已在 34 个科 89 个属 250 多种植物中获得单倍体植株。我国在花药培养技术和应用方面处于世界领先地位，据统计至少有 32 种谷类植物、蔬菜等植物首先在我国得到单倍体植物，包括小麦、玉米、高粱、辣椒、甜菜、甘蔗等，其中烟草和小麦等作物已有若干新品种投入生产。

1. 单倍体育种的方法 单倍体育种程序及操作技术简述于下。

(1) 花药培养。选择成熟度适中的花蕾或幼穗，通过无菌操作取出花粉进行预处理。用甘露醇或其他糖及无机盐配成的高渗溶液处理，有利于单倍体愈伤组织的形成。采用高温（35℃）或

低温(4~10℃)处理,可明显提高某些植物单倍体胚的比例。花药培养基大体有两种类型,对于多数植物,在愈伤组织培养中添加适量的生长激素类,特别是2,4-D能有效地促进禾谷类花药产生花粉愈伤组织。但有些植物如烟草、曼陀罗等只需在简单的蔗糖和无机盐培养基上,即可完成从花粉去分化、单倍体胚的形成乃至单倍体植株长出这一完整的过程。无论是长出愈伤组织还是单倍体胚都应适时转移至添加细胞分裂素类激素的分化培养基中,以利于植株生成。

(2) 花粉培养。由于花药培养时,一些二倍性的花药壁细胞也能形成愈伤组织,从而增加了培育单倍体植株的难度。花粉培养可以克服这一缺点。分离的花粉培养属于单倍体细胞培养,花粉细胞增殖的结果即可获得单倍无性繁殖系。1974年Nitsch等首创用挤压法分离花粉进行培养的方法,他们从烟草成熟花蕾取出花药,通过预处理用机械挤破花药,制成花粉悬液,经培养得到5%的花粉植株。1977年Sunderland等将花蕾或幼穗在7℃下冷处理两周后,将其在适当的液体培养基表面培养,待花药自然开裂散落出花粉,离心搜集花粉培养,这种方法使花粉成株率有所提高,但仍然比花药培养低得多。不过花粉培养一旦成功,则可较明确地判断为单倍体植株。

2. 单倍体的应用

(1) 作物育种。以上方法得到的单倍体培养物(愈伤组织、幼胚以及植株),其目的是为了对它们进行染色体加倍,从而获得纯合正常的二倍体植物。采用该法可缩短育种周期3~4代,加快育种进程,同时增加重组型的选择几率。我国把花培育种与常规育种有机结合起来,已先后育成小麦、水稻、玉米、油菜等作物花培新品种。至1995年底,用花药培养方法已育成小麦花培新品种10个、水稻22个、玉米1个。还有油菜、甜椒、烟草和果树等作物新品种,总计种植面积超过200万公顷,已成为世界上花培品种应用最广的国家。

(2) 物种进化。研究应用单倍体材料可查明其原始亲本的染色体组的构成、单倍体植物减数分裂的特征,形成二价染色体的可能性及其数目和形状,并且能够说明有无同源染色体和染色体组参与单倍体的组成。

(3) 遗传分析。单倍体的每一种基因都只有一个,所以在单倍体细胞内,不管是显性还是隐性,每个基因都能发挥自己对性状发育的作用。因此单倍体是研究基因性质及其作用的良好材料。

(四) 植物人工种子

人工种子技术是20世纪80年代中期兴起的一项高生物技术。它最早是由美国生物学家于1978年在国际园艺植物学术会议上提出的。美国已研制出了胡萝卜、芹菜、莴苣等植物的人工种子;日本正致力于研究水稻和蔬菜等作物的人工种子;我国在这方面的研究走在了世界前列,北京大学、中国科学院遗传研究所、西南农业大学、西南师范大学等在胡萝卜、马铃薯、苜蓿、芹菜、魔芋、蕹菜及水稻等作物的人工种子的制作技术及生理生化的研究方面取得了重要的进展。陈正华研究员领导的科研小组“九五”期间承担了“863”计划的“人工种子研制”项目,对马铃薯微型薯人工种子规模化生产技术进行了研究,研制出一种特制培养容器——培养罐及其高效操作技术,配合专用培养基实现了脱毒苗和微型薯的规模化生产。汤绍虎等以腋芽为材料进行了蕹菜及甘薯人工种子的研究,移栽存活率均达100%。郑卫红、倪德祥和邢小黑等以不定芽为材料进行了水稻杂种人工种子的研究。倪德祥和邓志龙报道紫杉和安祖花不定芽人工种子萌发率分别达92.7%和11.3%。Piccioni还以小鳞茎微繁殖获得的芽为材料,研究了百合等6种树木的人工种子。Nakashimade以辣根的小植株作为材料制作人工种子,发芽率达90%以上。

1. 人工种子的概念和基本结构

(1) 概念。人工种子是人工模仿天然种子结构制造出来的生命有机体，它能像种子一样萌发再生，并长成植物。人工种子的制造利用了细胞的全能性，将离体培养所产生的体细胞胚包裹在一层含有营养物质并具有保护功能的外膜内，成为在适宜条件下能够发育成完整植株的小颗粒。与普通的试管苗相比，人工种子具有可自动化批量生产、运输方便、可直接播种、发芽和生长发育比较整齐等优点。

(2) 基本结构。人工种子主要由胚状体、人工胚乳和人工种皮三部分组成。

①胚状体：人工种子的核心“部件”是一个被外层物包裹的具有类似种胚功能的胚状体，相当于天然种子的胚，但它与一般的种子胚不同。种胚是由该植物雌雄配子融合后形成的合子细胞进一步分化形成的，是种子的生命所在；而胚状体是由非合子细胞分化形成的类似于胚的结构物。胚状体具有极性，在一定的条件下可以分化出茎端和根端，通过胚胎发育程序形成植株。自然界中仅在少数植物中偶尔发现有天然形成的胚状体。目前主要从悬浮培养的单细胞、试管培养的愈伤组织、花粉或胚囊获得胚状体。国内外利用组织细胞培养法已成功地在烟草、水稻、小麦、玉米、甘蔗、棉花等 200 多种作物上诱导出了胚状体，其中约有 40 种进行过人工种子实验。

②人工胚乳：人工胚乳一般由含有供应胚状体养分的胶囊组成，养分包括矿质元素、维生素、碳源以及激素等。

③人工种皮：人工种皮具有保护作用。能够像天然种皮一样能在适宜条件下维持胚状体正常的生长发育，具备透水透气、固定成型、耐机械冲击且不损坏的特性。目前研究和应用较多的包埋基质是水凝胶性的海藻酸钠，它具有无毒、成本低和包埋制作工艺简单等优点。其他包埋基质如树脂、聚丙烯酸酯、甲基纤维素、铝胶囊、硅胶、琼脂、聚乙酰壳多糖等等都有成功报道。

2. 研究人工种子的意义

(1) 可使在自然条件下不结实或种子昂贵的植物得以繁殖。人工种子使得一些自然繁殖困难的名优珍贵品种（如同源或异源多倍体品种、一些濒危珍稀植物及宝贵的种质资源，或者自然繁殖有困难的植物）得以快繁。

(2) 固定杂种优势。人工种子在本质上属于无性繁殖，一旦获得优良基因型，即可以保持杂种优势。人工种子与常规育种和良种繁育技术结合，可大大缩短育种及良种推广的年限。

(3) 快捷高效的繁殖方式。天然种子在农业生产上受季节限制；而胚状体可常年在实验室获得，并可以用生物反应器大规模生产，及时为农业生产提供种源。

(4) 可人为控制植物的生长发育与抗逆性。在人工种子的制作过程中可向人工胚乳加进一些除草剂、弱病毒、杀菌剂、农药、植物生长调节剂及对植物生长有益的细菌等，使其具备抗逆性和耐贮性等优良特性。

主要参考文献

- [2] 焦瑞身等编. 生物工程概论. 北京: 化学工业出版社, 1991
- [3] Berg.H., *Biotechnoelectrochem and Bioenergetics*, 1992, 25: 455
- [4] 徐承水, 党本元编. 现代细胞生物学技术. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1995
- [5] 程东升, 李国兰. 微生物学通报. 1995, 22 (1): 14~17
- [6] 马志章, 蒋承波. 细胞生物学杂志. 1996, 18 (3): 111~115
- [7] 刘鼎新, 吕证宝编. 细胞生物学研究方法与技术. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997
- [8] 周胜军, 白志鹏, 刘凤军. 北京生物医学工程. 1998, 17 (3): 187~188
- [9] Muralidhar R.V., Panda T. Fungal Protoplast Fusion: A Revisit. *Bioprocess Engineering*. May, 2000, 22 (5): 429~431
- [10] 陈志南, 邢金良. 细胞与分子免疫学杂志. 2000, 16 (6): 461~463
- [11] 杨久炎, 邓伟根. 中国经济信息. 2000 (6): 15~17
- [12] Ferenczy L. et al. *Nature*. 1977, 268: 524~525
- [13] Halfmann H.J. et al. *Arch. Microbiol.* 1983, 134: 1~4
- [14] Farahnak. F. et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986, 51 (2): 362~367
- [15] 张博润, 蔡金科. 微生物学报. 1990, 30 (3): 182~188
- [16] 方霏祺, 李绍兰, 陈有为, 李萍. 生物工程学报. 1990, 6 (3): 224~229
- [17] 江慧修, 张金玲, 周坚等. 微生物学报. 1993, 33 (1): 22~31
- [18] Urano N, Sahara H, Koshhhino S, et al. *J. Biotechnol.* 1993, 28: 237~247
- [19] 刘伊强, 王维平, 潘乃隧等. 微生物学报. 1994, 34 (1): 76~80
- [20] Lima N, Moteira-C, Teixeira J A. *Microbios.* 1995, 81: 187~197
- [21] 甘志波. 微生物学杂志. 1996, 16 (1): 46~50
- [22] Benitez T, Gasent-Ramirez J M et al. *Biotechnol Prog.* 1996, 12: 149~163
- [23] 文铁桥, 赵学慧. 微生物学杂志. 1996, 16 (2): 19~22
- [24] 冯清平, 薛林贵. 微生物学报. 1997, 37 (1): 72~75
- [25] 文铁桥, 赵学慧. 微生物学报. 1999, 39 (2): 141~147
- [26] 王岁楼主编. 食品生物学技术. 北京: 海洋出版社, 1998
- [27] 彭志英主编. 食品生物技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- [28] 余健秀, 李健华, 庞义. 生物技术. 2000, 10 (3): 45~47
- [29] 施庆珊, 邱玉棠, 李良秋等. 微生物学杂志. 2000, 20 (4): 27~29
- [30] Jones C. W., Mastrangelo I. A. et al. *Science*. 1976, 193: 401~403
- [31] Pebeerdy J F. *Enzyme. Micro. Technol.* 1980, 2: 23~29
- [32] Farahnak F. et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986, 51 (2): 362~367
- [33] Ernandes J. R. *Biotechnol. Letter.* 1990 (12): 463~465
- [34] 江慧修, 张金玲, 周坚等. 微生物学报. 1993, 33 (1): 22~31
- [35] 程东升, 李国兰. 微生物学通报. 1995, 22 (1): 14~17
- [36] Campbell K. H. S. et al. *Nature*. 1996, 380: 64~66
- [37] Kiss R. 国外医学. 预防、诊断、治疗用生物制品分册. 1997, 20 (1): 28~31
- [38] 陈海昌, 刘波, 张苓花等. 微生物学通报. 1997, 24 (3): 159~161
- [39] Hu W. S. et al. *Curr. Opin. Biotech.* 1997, 8: 148~153
- [40] Wilmut I., Schnieke A. E. et al. *Nature*. 1997, 385: 810~813
- [41] Schnieke A. E. et al. *Science*. 1997, 277: 631
- [42] 王建华, 赵学慧. 生物工程学报. 1998, 14 (1): 112~114

- [43] Wakayama TV, Perry A.C. et al. Nature. 1998, 23, 394 (6691): 369~374
- [44] 胡显文, 肖成组, 李文清等. 生物工程学报. 1998, 14 (3): 348~251
- [45] 周胜军, 白志鹏, 刘凤军. 北京生物医学工程. 1998, 17 (3): 187~188
- [46] Russll, G.G. Stawatt. 微生物学杂志. 1998, 18 (3): 60~64
- [47] Cibelli J.B. Science. 1998, 280: 1256~1258
- [48] 丛春水, 邓继先, 苏志国. 生物技术. 1999, 9 (2): 26~30
- [49] 陈乃清, 赵浩斌, 荀德明等. 中国兽医学报. 1999, 19 (1): 89~91
- [50] 黄湘辉, 张文华, 朱红英. 细胞生物学杂志. 1999, 21 (1): 31~33
- [51] 周东坡, 平文祥等. 微生物学报. 1999, 39 (5): 454~460
- [52] 李军峰, 张家俊. Chinese Journal of Rabbit Farming. 2000 (1): 28~31
- [53] 陈孝康, 袁汉英, 潘辉等. 生物工程学报. 2000, 16 (1): 10~12
- [54] 戴琥, 赵佼, 谭文松等. 生物工程学报. 2000, 16 (2): 232~234
- [55] 严绍硕, 生物工程学报. 2000, 16 (5): 541~547
- [56] 柴伟栋, 范萍, 沈婕等. 南京医科大学学报. 2000, 20 (3): 329~333
- [57] 高峰. 细胞生物学杂志. 2000, 22 (2): 72~74
- [58] 施渭康. 细胞生物学杂志. 2000, 22 (4): 161~167
- [59] W. 巴尔茨 E. 赖因哈德等编. 夏镇澳等译. 植物组织培养极其在生物技术上的应用. 北京: 科学出版社, 1983
- [60] 俞新大, 张富国. 细胞工程. 北京: 科学普及出版社, 1988
- [61] 张自立, 俞新大. 植物细胞和体细胞遗传学技术与原理. 北京: 人民教育出版社, 1990
- [62] 陈因良, 陈志宏等. 细胞培养工程. 上海: 华东化工学院出版社, 1992
- [63] 陈峰, 姜悦. 微藻生物技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- [64] Tong-Jen Fu, Gurmeet Singh, Wayne R, Curtis. Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Food Ingredients. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, N. Y. 10013, 1999
- [65] Yongn. Lee, Fundamentals of Food Biotechnology. VCH Publishers. Inc. 1996
- [66] 宋思扬, 楼士林. 生物技术概论. 北京: 科学出版社, 2000
- [67] 郑国, 王新宇等. 高等植物花粉母细胞间细胞融合现象的研究. 兰州大学学报. 1999, 35 (3): 94~101
- [68] 常钰, 刘涤等. 植物细胞和器官大规模培养研究的进展. 生物技术通报. 2001 (1): 31~36
- [69] 邢建民, 赵德修等. 植物细胞培养生产黄酮类化合物研究进展. 生物工程进展. 2001, 21 (1): 47~50
- [70] 甘烦远, 郑光植, 彭丽萍. 红豆杉细胞培养的研究. 云南植物研究. 1996, 18 (2): 134~138
- [71] 甘烦远, 郑光植, 彭丽萍. 欧洲红豆杉细胞培养的研究. 应用与环境生物学报. 1996, 2 (3): 220~224
- [72] 孙彬贤, 章国英, 刘涤等. 红豆杉细胞培养与紫杉醇的生产. 植物生理学通讯. 1999, 35 (2): 135~140
- [73] 韩金玉, 王传贵, 那平等. 红豆杉细胞培养生产紫杉醇研究进展. 中草药. 1996, 27 (7): 433~437
- [74] 蔡朝晖, 高山林, 朱丹妮. 东北红豆杉愈伤组织的诱导、生长及紫杉醇含量的测定. 药物生物技术. 1995, 2 (3): 11~14
- [75] 元英进, 胡国武, 王传贵等. 镧、铈对红豆杉细胞生长及紫杉醇合成与释放的影响. 中国稀土学报. 1998, 16 (1): 56~60
- [76] 陈永勤, 吴蕴祺, 胡秋等. 苯丙氨酸、蔗糖和甘露醇对杂种红豆杉细胞的生长及形成紫杉醇、巴卡亭Ⅲ和10-乙酰基巴卡亭Ⅲ的影响. 药学学报. 1998, 33 (2): 132~137
- [77] 林岚, 鲁明波, 洪琦. 植酸对红豆杉细胞悬浮培养影响作用的研究. 生物技术. 1999, 9 (6): 8~11
- [78] 梅兴国, 张舟宁, 苏湘鄂等. 3-水杨酸对红豆杉细胞的诱导作用. 生物技术. 2000, 10 (6): 18~20
- [79] 孙彬贤, 翁颖琦, 刘涤等. 工作代谢中间产物和诱导子对南方红豆杉培养细胞生长和紫杉醇含量的影响. 上海中医药大学学报. 2000, 14 (3): 54~56

- [80] 周熠, 刘涤, 胡之壁. 气体成分对植物细胞悬浮培养的影响. 广西植物. 2001, 21 (1): 47~52
- [81] 谢秋玲, 郭勇. 诱导剂对植物细胞培养生产次生代谢物质的作用. 生物工程进展. 1998, 18 (4): 50~53
- [82] 刘春朝, 王玉春, 郑重等. 剪切力对植物细胞悬浮培养的影响. 化工冶金. 1998, 19 (4): 379~384
- [83] 宋经元, 任春玲, 祁建军. 生物诱导子在植物细胞培养生产次生产物中的应用. 天然产物研究与开发. 1999, 12 (4): 101~104
- [84] 张铭, 黄华荣, 魏小勇. 植物人工种子研究进展. 植物学通报. 2000, 17 (5): 407~412
- [85] 胡赞民, 邓向东, 陈正华. 马铃薯脱毒微型薯人工种子工厂化生产技术研究. 中国科学院院刊. 2001 (5)
- [86] 唐巍, 欧阳藩. 马铃薯人工种子的研究. 生物技术. 1996, 6 (5): 11~13
- [87] 杨光孝, 倪德祥. 植物人工种子的研制. 中国稻米. 1996 (5): 27~29
- [88] 汤绍虎, 孙敏, 李坤培. 人工种子研制. 园艺学报. 1994, 21 (1): 71~75
- [89] 蔡秋红, 陈启锋. 诱导子在植物细胞培养中的应用研究进展. 沈阳药科大学报. 2000, 17 (2): 152~156

第六章

蛋白质工程和分子进化工程

前几章我们已经讨论了现代生物技术中基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程在食品工程中的应用。随着这些技术的发展，在四大生物工程技术的基础上又出现了蛋白质工程、分子进化工程等新兴的生物技术，本章将讨论这两种生物技术及其在食品工程中的应用。

第一节 蛋白质工程的原理和方法

一、蛋白质工程的概念与起源

随着对生命过程研究与探讨的逐步深入，人们的认识已经不仅仅局限于对生命现象的描述以及对生命本质规律的了解上，人们希望能够在掌握现象与本质规律的基础上，人为地干预生命过程，依照人们自己的意愿改良、改造生物，甚至能够创造自然界所未曾有过的生物新种。这是一个长远的战略目标，作为现代生物学发展的宏伟蓝图，它具有广泛的吸引力和诱人的前景。生物科学理论和技术的迅速进步，使人们在相关方面的技术能力也达到了一个新的水平，分子遗传学、基因工程、蛋白质结构与功能以及计算机技术的发展，为这一目标的实现打下了坚实的基础。作为生物最基本的功能大分子之一——蛋白质是几乎所有生物功能的体现者，弄清蛋白质的结构、功能及其两者相互的关系的规律，并且定向地改良蛋白质，甚至构建全新的蛋白质分子已成为客观的迫切的需要。1982年 Winter 等首次报道通过基因定位诱变获得改性酪氨酸 tRNA 合成酶；1983年 Ulmer 在“Science”上发表以“Protein Engineering”（蛋白质工程）为题的专论，这标志着一个新的独立的学术领域“蛋白质工程”的诞生。

蛋白质工程是继基因工程以后又一个可根据人们自己的意愿改造天然生物大分子，甚至可以设计和创造全新的非天然的生物大分子的生物技术。蛋白质工程可赋予蛋白质特殊的性质和功能，满足人们在某些特定条件下的特殊需要。选择蛋白质为研究对象，是基于蛋白质具有多种多样的功能，以及它在各行各业的广泛应用，因而会使这一技术更具有实际价值和开发前景。通常蛋白质工程是以基因操作为基础的，是基因工程技术的发展和延伸，所以又被称为“第二代遗传工程”。

什么是“蛋白质工程”？严格地说就是以蛋白质结构和功能的研究为基础，运用遗传工程的方法，借助计算机信息处理技术的支持，从改变或合成基因入手，定向地改造天然蛋白质或设计全新的人工蛋白质分子，使之具有特定的结构、性质和功能，能更好地为人类服务的一种生物技术。

天然蛋白质经历了自然界长期的进化过程，已经能够很好地适应生物所处的内外环境，有序而协调地发挥其功能。可以说天然的正常构象是蛋白质的最佳状态，它既能高效地发挥功能，又

便于机体的正常调控，因而极易失活而中止作用。但在生物体外的条件下，特别是工业化的粗放生产条件下，这种可被灵敏调节的特性就表现为酶分子性质的极不稳定性，导致难以持续发挥应有的功能，成为限制其推广应用的主要原因。如温度、压力、机械力、重金属、有机溶剂、氧化剂以及极端 pH 等都会影响它的作用。蛋白质工程技术针对这一现状，对天然蛋白质进行改造改良或全新设计模拟，使目的蛋白质具有特殊的结构和性质，能够抵御外界的不良环境，即使在极端恶劣条件下也能继续发挥作用，因而蛋白质工程具有广阔的应用前景。

举例来说，凝乳酶的蛋白质工程实现了凝乳酶原在大肠杆菌 (*E. coli*) 系统中的高效表达。通过改变表达质粒核糖体结合位点附近区域的碱基组成，使凝乳酶原的表达量占细胞总蛋白量的 30%~40%。凝乳酶是乳品工业中重要的酶制剂，在美国由大肠杆菌系统中表达的重组牛凝乳酶原制剂已经获得了美国食品药品监督管理局 (FDA) 的批准，应用于干酪的生产。再如葡萄糖异构化酶蛋白质工程，从链霉菌株中调取的基因实现了在大肠杆菌系统中的高效表达，并已实现工程菌的中试规模工业化条件的发酵生产，获得一株突变体，其比活与野生型酶相当而最适温度提高 10℃，且 80℃ 热失活半衰期也延长一倍，有利于在葡萄糖异构化酶反应的平衡体系中果糖的形成，在食品及轻工行业中有极大的潜在应用价值。

蛋白质工程的出现是生物技术发展到现阶段的必然产物，同时也是社会生产实践和生物科学研究的客观需要。仅以具有催化功能的蛋白质——酶为例，人们迫切需要具有高度稳定性和高效催化性的生物催化剂，以适应各种各样的不同的环境体系的需要，特别是极端恶劣条件下，仍然能够保持其高效的催化功能。这就可以从根本上改变现代工业体系中高温高压的操作特点，极大地降低能耗、降低成本，同时也减小劳动强度，改善生产环境。

蛋白质工程是在现代生物学理论和技术充分发展的基础上诞生的，同时也是借助于其他许多学科相互渗透、相互作用而发展的，如物理学、化学、工程学以及计算机技术等等。主要包括以下两大方面：分子遗传学的相关理论与技术和蛋白质结构功能相关的理论与技术。在分子遗传学方面有：完整 cDNA 的克隆技术、DNA 序列的快速测定技术、DNA 序列推测蛋白质序列的多维程序系统、原核生物及真核生物基因表达过程的调控、基因的定位诱变及随机诱变理论与技术等等。在蛋白质结构功能分析方面有：蛋白质一级结构——氨基酸序列的分析，X 光单晶衍射结构分析技术，二维和三维核磁共振结构分析技术，蛋白质结构数据库的建立，蛋白质功能的酶学和免疫研究技术，蛋白质分子力场、能态、自由能等生物物理学研究技术，计算机模拟处理结构分析系统等等。这两大类理论与技术相互关联、相互促进，借助其他多类学科的支持，完成对蛋白质分子结构与功能分析和归类，进一步展开突变蛋白质的分子模拟与预测，实现蛋白质的改造，以及全新蛋白质的分子结构与功能的设计，在计算机模拟的基础上，进行蛋白质分子的化学修饰、合成的实际操作，验证分子设计的结果，获得具有特定结构、性质和功能的目的蛋白质。

二、蛋白质工程的原理

(一) 蛋白质工程的原理

蛋白质工程的目的是要对目的蛋白质进行结构和功能上的设计与改造，以满足人们特定条

件下的需要。有了上述一系列生物学的理论与技术的支持，我们就可以实现这一过程。我们以蛋白质结构与功能的研究为基础，掌握蛋白质活性中心的结构，包括催化中心和调节中心的空间构象，了解构成中心的各氨基酸残基及其侧链基团的位置，再借助计算机图像与处理系统的模拟进行分子辅助设计，提出对目的蛋白质的改建或构建方案，确定活性中心的氨基酸残基组成，并辅助设计和预测其结构功能的变化。蛋白质的空间结构信息主要隐含在它的氨基酸序列之中，计算机辅助处理系统可以通过生物物理学原理，模拟预测氨基酸序列的变化对蛋白质空间结构的影响。氨基酸序列是由编码这个蛋白质的基因的核苷酸序列所决定的，因此按照预定目的蛋白质分子的改进或构建方案，进行编码该蛋白质基因的修饰和合成，再通过遗传工程途径，在适当的载体系统表达就可以获得所需要的目的蛋白质，这一过程可以重复循环进行，最终达到目的蛋白质分子的结构、性质和功能符合设计的要求。

(二) 蛋白质工程的组成部分

图 6-1 是蛋白质工程的流程图，由图中可知，蛋白质工程主要包括以下几个组成部分。

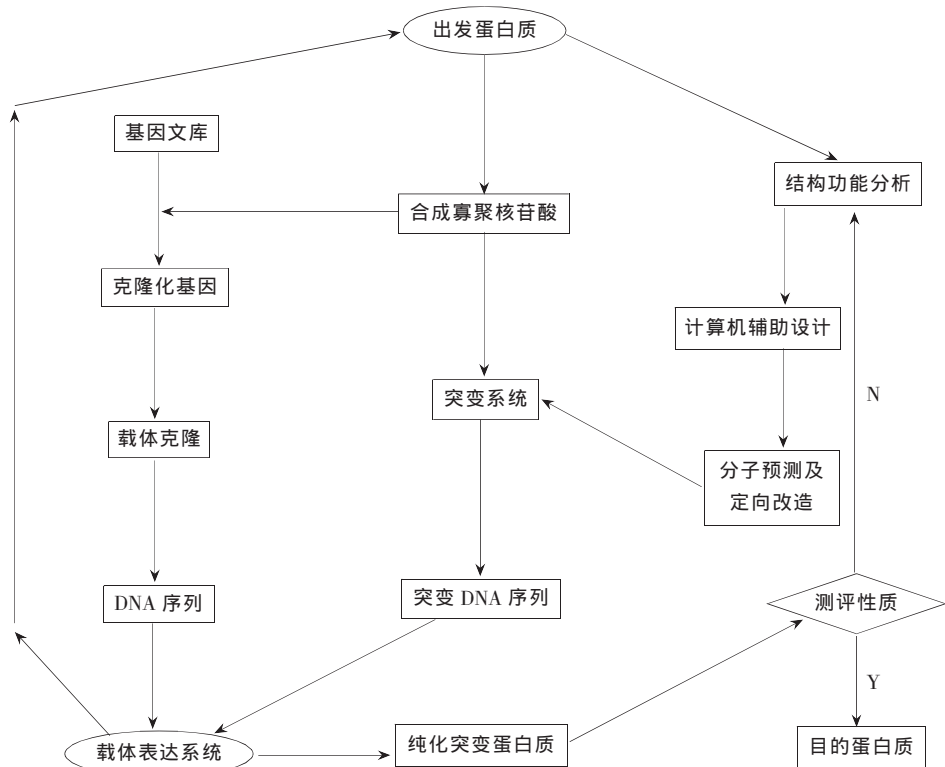


图 6-1 蛋白质工程流程图

1. 蛋白质放大扩增系统 由组织提取的少量纯化的蛋白质，通常只有 0.1~1.0mg，作为出发蛋白质分子。先解析部分肽段的一级结构，根据遗传密码设计并合成相应的同位素标记寡聚核苷酸片段，再由此从基因文库中调出该蛋白质的克隆化基因，转入 DNA 序列分析系统测定 DNA 序列并克隆化，最后通过表达载体系统扩增蛋白质的量，达到能够分析出发蛋白质的结构功能的

水平,通常要达到 0.1~1.0g 的蛋白量。

2. 蛋白质结构功能分析及分子设计系统 由上一系统获得足量的出发蛋白质后,通过目前已经具备的蛋白质结构分析方法,分析蛋白质的一级结构和空间结构。X 光衍射分析晶体蛋白质的结构,而三维核磁共振法研究溶液中的蛋白质结构,同时研究该蛋白质结构与功能的关系,并将结果输入计算机图像处理系统和结构处理系统,根据生物物理学原理以及已知蛋白质结构功能数据库的基本规律,从结构与功能研究出发,进行分子结构分析与模拟,进一步辅助设计和功能预测,提出分子的预期性质和改造或构建方案,完成突变蛋白质的分子设计或构建过程。

3. 突变蛋白质的合成表达系统 这一系统是将突变方案通过分子遗传学方法实施的过程即蛋白质的定点突变技术,改造或构建方案通过合成突变寡核苷酸,引入定位突变,或采用其他方法引入突变,并进入克隆系统分离出突变 DNA,以此作为模板,引入载体表达系统,扩增表达获得大量的突变蛋白质。对获得的突变蛋白质进行结构、性质和功能分析、测试与判定,如符合分子设计的要求,则获得目的蛋白质;如不能满足实际要求,则再由分子设计系统重新指导设计,进入新一轮循环,最终获得满足人们要求的蛋白质。

(二) 蛋白质工程操作中的问题

正如一般生物技术的发展过程一样,蛋白质工程虽然在理论上是完全可行的,但在实际操作中,仍然存在不少问题需要解决。主要有以下两个方面:一方面是有关分子遗传学和基因工程的问题,如更有效 cDNA 克隆技术,精确高效的定位突变技术,高效目的基因表达系统等等;另一方面是有关蛋白质结构功能研究的理论和技术,如准确地由一级结构推测高级结构,肽链折叠的精确控制,蛋白质的翻译后修饰,蛋白质结构可变性,分子动力学与蛋白质功能的关系,蛋白质在晶体、溶液以及细胞中的不同存在状态及其对蛋白质性质、功能的影响等等。除此以外,还有一些相关辅助技术,如微量蛋白质的纯化鉴定技术、更有效的蛋白质结晶方法、计算机辅助系统的有效性等。所有这些问题中,有关蛋白质结构功能方面的问题尤为突出,这成为蛋白质工程研究和应用的主要限制因素。

尽管蛋白质工程相关技术还很不成熟,但是这一生物技术已经取得了令人瞩目的成就,特别是在酶制剂的性质改良方面,取得了突破性进展。许多突变的工程酶,如枯草杆菌蛋白酶工程酶,已获得了专利,并已广泛应用于食品、轻化工行业了。

三、蛋白质工程的工作定义

由于蛋白质工程技术还存在以上一系列问题,特别是蛋白质结构功能方面的理论和技术还远不能满足蛋白质工程的需要,要发展到成熟的水平还需要较长的时间。为使这一情况发生根本的改变,我们在实际运用蛋白质工程时,很自然地会采用一些其他的生物学方法或战略来弥补,以取得较好的效果,我们称这些为“广义的蛋白质工程”,也称为“蛋白质工程的工作定义”。这样就能不拘泥于所谓“严格的”蛋白质工程概念,在指导研究工作和实际应用时扩大了使用范围,较好地适应和满足了当前蛋白质工程研究的实际需要。

广义的蛋白质工程,即蛋白质工程的工作定义,也就是当前蛋白质工程的主要研究内容,概括起来主要有以下几个方面。

(一) 建立蛋白质工程的研究方法系统

这是指在研究某些蛋白质一级结构及其与结构功能元件相互关系的基础上建立起应用蛋白质工程方法的系统。

现代蛋白质结构理论研究显示,蛋白质或多肽的立体结构实际上可以是由一些相对稳定的结构元件组装而成,而且蛋白质或多肽的实际功能也与这些结构元件相对应。这就启发我们可以通过对这些蛋白质或多肽的“结构-功能元件”的分解组合,即采用“分子裁剪”的方法获得具有特定结构功能的新的蛋白质。在研究过程中我们可以不必对整体蛋白质的一级结构及高级结构的关系过于苛求,只要了解这些元件的结构、功能关系就能够满足需要了,这样大大简化了蛋白质工程的难度,使其操作的可行性增加。实际上,蛋白质在自然界的进化过程也极有可能就是采用这一方式进行的。因为这种方式可以在较短的时间内获得具有新性状蛋白质分子,同时也节约使用有限的遗传信息资源,具有较强的适应能力。对蛋白质工程而言,已知基因的蛋白质也可以很容易地通过基因定位诱变的方法,根据“中性突变”原则,把蛋白质结构功能元件两端的 DNA 序列修饰成限制性内切酶位点而不改变蛋白质的氨基酸顺序,实现某段基因编码 DNA 的重组,最后实现对蛋白质结构-功能区域的分解重组。这类方法应用较多的是抗体免疫球蛋白分子上的试验,在轻链、重链 12 个结构域中,有试验将人的抗体分子重链上的抗原互补决定簇换成了小鼠的抗原决定簇,结果小鼠的单抗分子所具备的抗原结合专一性的确转移到人的抗体上了。这就可以用小鼠制备单抗,然后转移给人的抗体,使重组体具有与人的单抗同样的效果,这种制备的方法要比直接制备方法简单方便。有些蛋白质的功能特性与特定的氨基酸侧链有关,这类蛋白质的改造,一般来说也不需要以完整的空间结构为基础进行分子设计,只要改变相应的氨基酸种类即可,但是如何进行改变,换成哪种氨基酸,置换后将会对蛋白质结构功能有何影响,则要仔细研究和筛选了。

(二) 随机诱变基因库的定向筛选

这一方法是利用目的基因表型具有高效检测筛选系统这一特性,在目标条件下从随机诱变基因库中分离出目标基因,最终获得突变蛋白质。此方法对结构以及结构与功能关系还不很明确的蛋白质分子也能适用。

对许多蛋白质而言,精确结构以及结构与功能关系均不易明确,我们就不能用严格定义的蛋白质工程方法来改造或构建。但有许多蛋白质功能明确,而且有灵敏、快速、高效、简便的功能检测方法。如果我们对目的蛋白质基因或基因上某个区域在体内或体外进行随机诱变,建立突变型基因库,并通过载体系统表达突变蛋白质,用高效检测系统在预定条件下筛选,就可能获得预期的突变蛋白质。这一方法由于具有构思新颖、方法可行、背景知识要求低等突出的优点,因而发展迅速,逐渐拓展延伸成为改造生物大分子的主要研究手段,最终形成以非合理设计为基础分子进化工程技术。这部分内容将在本章的第三节详细介绍。

(三) 研究蛋白质结构与功能的关系

这是指利用各种方法,包括蛋白质工程的方法,研究和阐明蛋白质分子结构与功能关系,并且尽可能达到定量描述的水平。

虽然蛋白质结构与功能关系的研究,不属于严格意义上的蛋白质工程的研究范围,但是应该看到它是蛋白质工程研究的基础,它能为蛋白质的分子改造或分子构建等设计过程提供基本参考

数据,同时也进一步促进蛋白质工程的发展与应用。内容包括:蛋白质活性中心(催化中心和调节中心)的鉴定,确定蛋白质中各个关键氨基酸残基在结构和功能中的作用和贡献,研究蛋白质的折叠过程及其折叠中间体的能量状态和稳定性,研究蛋白质与蛋白质之间,以及蛋白质与其他生物大分子之间的相互作用和相互识别等。同样前面所讨论的两大类工作也能为蛋白质的结构功能研究提供基础资料和数据,因此也可以用于蛋白质结构功能关系的研究。

(四) 严格意义上的蛋白质工程

这是指在深入了解某一个蛋白质结构与功能关系的基础上,经过有目标的、严格的分子设计,定向地改造或构建一个具有特定性质和功能的目的蛋白质,这也是蛋白质工程的最终目标,是我们研究的主要努力方向。

严格意义的蛋白质工程有以下几种类型:一是对天然蛋白质的改造,包括小改(即只改变蛋白质中的少数几个氨基酸残基)、中改(即进行适当的分子剪裁和组合)以及大改(即进行蛋白质分子的局部重建)。二是完全重新构建一个自然界中没有的全新的蛋白质,即从头设计合成新的蛋白质。对于局部重建的大改和从头设计的构建来说,只有当我们已经基本掌握了蛋白质一级结构与高级机构之间的关系,掌握了蛋白质结构与功能之间相互关系的规律以后,才能真正地把握这一过程。这就需要至少掌握1500个以上的蛋白质的一级结构及其精确的三维空间立体结构数据,并建立相应的数据库,研究三维立体结构的规律,才能把握空间结构与功能之间的关系。目前虽然已经确切了解空间结构的蛋白质数据在600个以上,但还远远不能满足蛋白质空间结构研究和蛋白质结构与功能关系研究的基本需要。不过,从已知的这些数据中也已经可以总结出不少“一级结构-高级结构”、“结构-功能”之间的规律性,因此这方面的工作也已经有人开展了。如已有实验获得了几种降钙素的类似物;合成模拟胰凝乳蛋白酶,一个具有分支四螺旋多肽结构,其酶的催化活性与天然蛋白质相比仅相差两个数量级;另外,人工合成钙选择性离子通道也有报道,这些都是类似蛋白质全新合成的产物。

建立在分子遗传学基础上的生物学方法,即从改变和合成基因入手,定向改造天然蛋白质或者构建全新蛋白质分子的方法,虽然是蛋白质工程中最主要的方法,但是在一定条件下化学方法合成蛋白质或多肽,也是方便可行的。特别是含有非肽成分的蛋白质的改造与构建,或非肽模拟构建新功能的蛋白质类似物时,化学方法更是必不可少。实际上许多蛋白质的活性中心结构中都包含有非肽的辅基成分,不管它们与肽链成分是否是共价连接,化学合成方法的应用都是必然的。另一方面,蛋白质和多肽的化学合成,无论是从合成的长度方面,还是从合成的精度方面,都有了很大的突破,并且已经可以利用亏肽连接,拼接两个肽片段,使蛋白质的肽链合成摆脱了必须线性单向延长的单一模式,向多元化合方式发展。

在非肽模拟中,利用非氨基酸成分作为结构元件,模拟多肽、蛋白质的功能,也成为蛋白质工程发展的方向之一。我们常常用普通有机分子来搭建在构象和活性方面与某一活性肽或活性蛋白质类似的化合物。例如通过对脑啡肽构象的研究,设计出空间结构类似的“两苯环相互接近”模式,所构建出的吗啡和苯并吗啡都是阿片受体的激动剂;胆囊收缩素(CCK)的降解产物CCK-4的最低能量构象与麦角胺相似,而麦角胺也具有胆囊收缩素相同的中枢药理作用。

在蛋白质工程的研究和应用中,尽管还存在许多问题尚未解决,其理论和技术还很不成熟,但是它已经向人们展示出了勃勃生机。在蛋白质工程领域中适时适当地结合应用各种生物学、化

学、物理学的方法，无论是经典的还是现代的，定向设计还是随机筛选，单一的还是组合的，都完全可以开辟出一片新的天地。特别是蛋白质的全新设计和非肽模拟，可以按照人的意愿创造出自然界中不存在的，又能为人类所利用的全新的生物大分子，极大地提高社会的生产效率。随着对蛋白质结构和功能的深入了解，蛋白质工程的发展速度必将越来越快，蛋白质分子设计也必将更加合理、更趋完善。这不仅会对生命科学领域产生深刻的影响，最终将彻底改变传统工业的高温、高压、高能耗的局面，使之成为节省能源，较为温和的，但却更为高效的生产方式。

四、蛋白质工程的主要研究方法

根据蛋白质工程的严格定义和广义定义所确定的研究范围和内容，蛋白质工程所涉及的主要研究方法包括：蛋白质的分离纯化鉴定方法、结构分析方法、功能研究方法和进行结构改造的分子生物学研究方法。

在这四类根据蛋白质工程的操作步骤而划分的主要研究方法中，蛋白质分离纯化鉴定方法与生物化学中的常规方法没有本质的区别，是对许多结构、性质相似的一系列突变蛋白质的分离、纯化和鉴定，但其难度要大得多，通常需要运用多种高精度的方法才能实现，如亲和层析、等电聚焦、免疫沉淀等，这里就不做详细介绍。蛋白质功能研究方法必须根据不同种类的蛋白质所具有的不同功能，相应地采用不同的研究方法。如对具有催化活性的蛋白质——酶，则用酶学的稳态动力学方法；对抗体则用免疫学方法；其他蛋白质如激素、生长因子、受体类以及核酸结合类蛋白质都有相应的研究方法。所有这些蛋白质功能的研究中，建立一套高效、简便的蛋白质功能测定方法是成功的关键。对特定的蛋白质，我们希望能够找到特异专一性的检测方法，可以极大地提高研究的效率。因此在分子生物学和蛋白质工程研究中，对不同功能蛋白质特异性检测方法的研究，也是重要的研究方向之一。

（一）蛋白质结构分析方法

蛋白质结构分析方法主要是指与研究蛋白质的空间结构有关的理论与技术。主要包括：蛋白质一级结构（即氨基酸序列）的测定方法、蛋白质晶体学、核磁共振法、蛋白质折叠过程研究、蛋白质生物物理研究法以及蛋白质工程的计算机辅助设计与模拟研究等。

1. 蛋白质一级结构分析方法 蛋白质一级结构研究，即氨基酸序列的测定，其原理不外乎片段重叠、逐级降解、cDNA 以及质谱法等几种，其中片段重叠和逐级降解是最常用的方法。其分析原理见图 6-2。

蛋白质氨基酸序列测定在超微量分析研究方面取得的重大突破，使得微量氨基酸序列自动分析仪已经广泛应用，例如对一个分子量为 33×10^3 的蛋白质，只要有 $30 \times 10^{-15} \sim 300 \times 10^{-15}$ g 分子的纯化蛋白质就可以解决序列测定问题，比微量蛋白质测序技术所需样品量低 100~1 000 倍。

2. 蛋白质构象研究方法 在蛋白质高级结构研究方面，X 光衍射和三维核磁共振是蛋白质空间构象研究最主要的分析手段，分别用于对结晶蛋白质和溶液中蛋白质空间构象的研究。X 光衍射主要对结晶蛋白质的各向基团的空间排布进行分析，对蛋白质分子的整体空间构架研究作用很大。而三维核磁共振可以直接对水溶液中的蛋白质结构进行分析，溶液中的空间构象更接近于

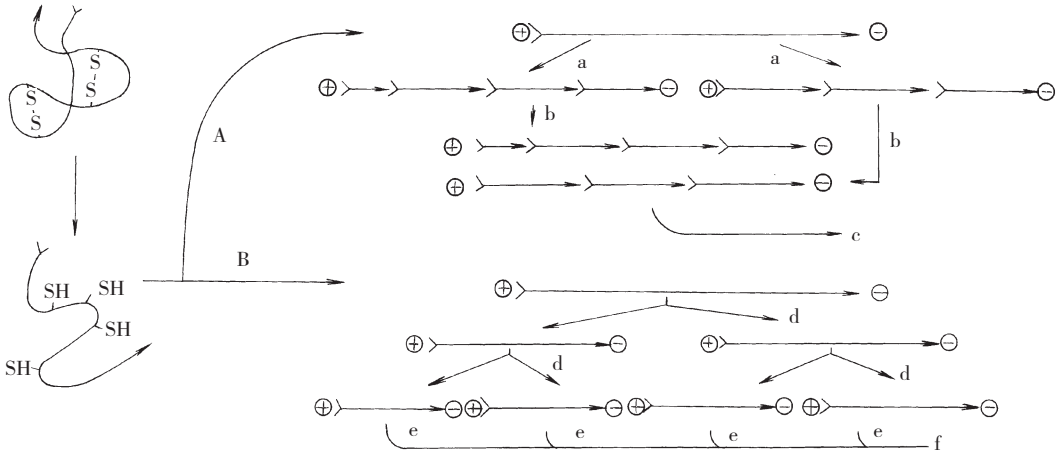


图 6-2 蛋白质一级结构测定原理

A. 片段重叠法 B. 逐级降解法

a. 专一性酶解 b. 测序 c. 由接头肽连接序列 d. 特异性降解 e. 测序 f. 由降解顺序获得序列

生物体中的自然状态，更能反映蛋白质在执行功能时的实际构象状态。

3. 蛋白质折叠过程研究方法 蛋白质折叠过程研究方法，也就是蛋白质折叠机理研究，是蛋白质化学及分子生物学最前沿的课题之一。而基因工程、蛋白质工程的出现更迫切需要解决这一难题，因为蛋白质工程所改造或设计的目的蛋白质，在折叠机制还不清楚的情况下，就不可避免地带有很大的盲目性，更谈不上准确地预测不同的分子设计给蛋白质带来的结构和性质的影响。分子生物学、蛋白质工程等相关学科的迅速发展，给蛋白质折叠机理研究提供了全新的方法和思路，极大地促进了蛋白质折叠机制研究的发展。蛋白质折叠过程研究是蛋白质化学中最重要的中心课题之一，它的阐明将为人类改造、创建蛋白质乃至其他生物大分子奠定理论和技术基础。目前对蛋白质折叠研究主要通过对蛋白质变性、复性过程的热力学和动力学研究，以及对折叠中间体的研究而进行的。变性、复性过程是指蛋白质一级结构不变而高级结构发生改变的过程，实际上就是蛋白质分子中次级键发生改变的过程，就是反映了蛋白质中肽链的折叠、卷曲过程。定量地观察、描述和研究蛋白质变性、复性过程，就可以研究肽链的折叠过程。热力学研究反映了过程中的能量状态，动力学研究反映了折叠、卷曲过程与时间之间的关系。通过研究折叠中间体来研究折叠途径也是一种常见的方法。蛋白质从天然状态到变性状态，或从伸展状态折叠到天然构象，是一个渐变过程，其间必然要经过许多中间过渡态，那些较为稳定的过渡态是折叠过程的限速步骤，这种较为稳定的肽链构象称为折叠中间体，它可以有效地反映蛋白质的折叠途径。尽管绝大多数折叠中间体很不稳定，由于三维核磁共振技术的发展，加上氢交换技术及快速混合技术的成熟，我们已经可以有效地研究这些中间体了。目前流行的蛋白质折叠过程理论是 Anfinsen 提出的随机成核理论：即线性多肽链折叠呈现“成核—折卷—凝集”三个阶段。成核作用是由于挤压效应或疏水作用，多肽链中的一些小肽段迅速形成螺旋性的核心区；折卷则是已成核的结构散落成为较大的超二级结构单元的集合体；凝集则是集合体在原子水平凝集，形成致密的三级结构。

4. 蛋白质生物物理研究方法及计算机结构模拟研究 蛋白质的结构研究方法,除了以上的实验方法以外,理论分子生物物理学方法也是重要的途径之一。随着生物物理、化学以及数学学科的发展,特别是分子力学、分子动力学的发展及其与计算机信息处理技术的结合与发展,利用蛋白质分子内部及其周围环境原子之间的作用,以计算机信息处理系统为工具,研究蛋白质的能量、结构、热力学、动力学性质,进行蛋白质空间结构规律研究和预测,取得了突破性的进展。由印度人 Ramachandran 提出的硬球模型建立了非成键原子最小接触距离原则,并以实验数据为基础作了 Φ - Ψ 构象图;在分子力场、能量最低和自由能计算等的基础上,通过动力学的统计分析方法,借助计算机信息处理系统,分析蛋白质的空间结构,预测蛋白质构象的变化,大大减少了蛋白质结构研究的盲目性,提高了效率。理论分子物理学方法的建立,使蛋白质结构的研究摆脱了必须完全依赖实验过程的传统模式,开辟了利用计算机模拟研究的新思路,推动了蛋白质结构研究的进程。

(二) 分子生物学研究方法

基因工程方法,也称分子遗传学方法,是一类涉及遗传物质基因(DNA)的生物学理论与操作技术,它包括寡聚核苷酸(又称为寡核苷酸)片段及基因的人工合成、目的基因的克隆与分析、目的基因的定位诱变或随机诱变、目的基因在载体系统中的高效表达等。

1. 寡聚核苷酸片段及基因的人工合成 由于DNA自动合成仪的广泛应用,寡聚核苷酸片段及基因的合成,即DNA的化学合成,现已经成为分子生物学及遗传工程、蛋白质工程研究中的常规技术手段之一。无论从合成寡聚核苷酸片段的长度,还是合成的总量来说,都已经达到相当的规模水平。所合成的产物DNA片段也有着多方面的用途,除合成全基因或改造基因这一基本用途而外,还可用作探针筛选目标基因,作为引物用于基因的定位诱变或聚合酶链式反应(PCR),也可合成连接接头(linker)用于基因末端改造等,还可以用于研究基因的调控及基因与其他生物大分子的相互作用。

2. 目的基因的克隆与分析 应用于蛋白质工程中目的基因的克隆与分析技术,与常规基因工程中的方法没有本质的差别。一般也包含下面几个基本部分:源DNA的获得;DNA片段与克隆载体的体外连接;重组后载体引入宿主复制放大建立克隆基因库;筛选基因库,获得目的基因克隆;最后再进行目的基因的结构分析。整个克隆与分析流程见图6-3。

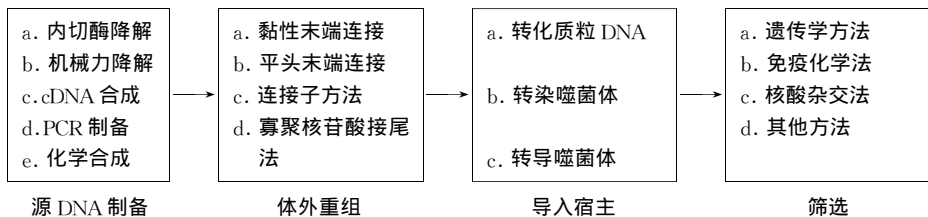


图 6-3 目的基因克隆分析流程

首先是源DNA的制备,即获得包含目的基因在内的一系列具有一定大小的DNA片段。限制性内切酶降解法和机械剪切力降解法是最常用的制备方法,此外还有cDNA合成、PCR扩增以及直接化学合成等多种方法。这些方法各有特色,各有优缺点,适合不同的具体条件应用。其次是DNA的体外重组,即制备好的系列DNA片段与克隆载体在体外进行连接。连接方法有黏

性末端法、平头末端法、连接子法和寡聚核苷酸接尾法等。第三是重组 DNA 导入宿主建立克隆基因库。重组后的载体引入宿主，复制、放大得到一群克隆的集合，即克隆基因库，库中所包含的信息量为源 DNA 中所有基因信息的总和。克隆导入的方法有转化质粒 DNA、转染噬菌体 DNA 和转导噬菌体等三种。所建的基因库按源 DNA 分，可以是染色体（基因组）基因库，也可以是 cDNA 基因库；按克隆载体分，可以是噬菌体基因库，也可以是 Cos 质粒基因库或者是普通质粒基因库。最后是目的基因克隆的筛选，即从克隆基因库中调出所需要的目的基因。快速而高效的目的基因克隆筛选方法的建立，是基因克隆成败的关键之一。常用的方法有遗传学方法、免疫化学法和核酸杂交法三种，其中遗传学方法是经典的传统的方法。对目的基因的结构分析，除了需要测定基因的 DNA 序列外，还要注意到基因中内含子的存在，注意考虑基因个体差异性、发育多态性和进化多样性等因素的影响。

3. 目的基因的定点诱变 定点突变 (site-directed mutagenesis) 技术是对已知 DNA 序列的基因或基因片段中任意指定位置进行突变的技术。它可以按照人们的意愿在指定的位置实现核苷酸的取代、插入或缺失。该方法比使用化学因素、自然因素导致突变的方法具有突变率高、简单易行、重复性好的优点，在蛋白质工程中主要应用于需要改变的氨基酸残基位置可以预先确定的情况下。目前常用的定点突变方法有寡核苷酸引物介导的定点突变，PCR 介导的定点突变及盒式突变。

(1) 寡核苷酸引物介导的定点突变。寡核苷酸引物介导的定点突变的原理是用含有突变碱基的寡核苷酸片段作引物，在聚合酶的作用下启动 DNA 分子进行复制，将引物中的突变引入到基因中。其主要的过程见图 6-4。

从图 6-4 中可看出该方法有下述 6 个步骤：①将待突变基因克隆到突变载体上。②制备含突变基因的单链模板。③引物与模板退火 5' 端磷酸化的突变寡核苷酸引物，与待突变的核苷酸形成一小段碱基错配的异源双链的 DNA。④合成突变链，在 DNA 聚合酶的催化下，引物以单链 DNA 为模板合成全长的互补链，而后由连接酶封闭缺口，产生闭环的异源双链的 DNA 分子。⑤转化和初步筛选异源双链 DNA 分子转化大肠杆菌后，产生野生型、突变型的同源双链 DNA 分子。可以用限制性酶切法、斑点杂交法和生物学法来初步筛选突变的基因。⑥对突变体基因进行序列分析。

利用此方法进行的定位突变常常会产生突变效率较低的现象，其主要原因是大肠杆菌中存在甲基介导的碱基错配修复系统所致。近年来这一方法已有了许多改进，如尿嘧啶取代法、缺口双链 DNA 法、双引物法等均是利用对大肠杆菌碱基错配修复系统的抗性来提高突变率的。另外也有人采用改进的质粒作为载体，这就省去了单链模板的制备步骤，节省了时间。

(2) PCR 介导的定点突变法及其改进——大引物突变法。PCR 反应的出现推动了定点突变

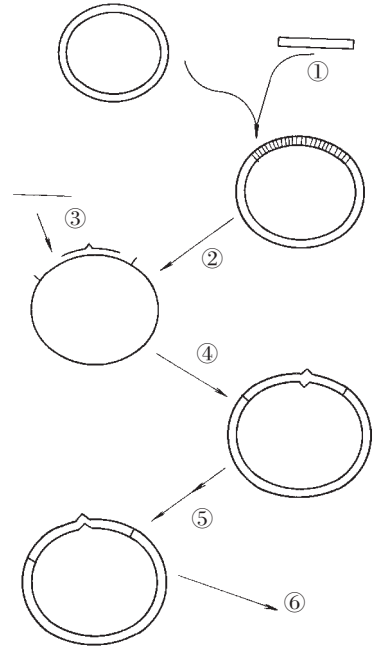


图 6-4 寡核苷酸引物介导的定点突变

的发展,以 PCR 为介导的定点突变为基因修饰、蛋白质改造提供了另一条途径。如通过改变引物中的某些碱基而改变基因序列,达到有目的地改造蛋白质结构和研究蛋白质的结构和功能之间的关系的目的。还可以在设计的引物 5' 端加入合适的限制性内切酶位点,为 PCR 扩增产物后续的克隆以及蛋白质的分子裁剪拼接提供方便。

经典 PCR 介导的定点突变法,需要 4 种扩增引物,进行 3 次 PCR 反应,其简单过程由见图 6-5 所示。头两次 PCR 反应中,应用两个互补的并在相同部位具有相同碱基突变的内侧引物,扩增形成两条有一端可彼此重叠的双链 DNA 片段,去除未参与的多余引物之后,这两条双链 DNA 片段经变性和退火可以形成具有 3' 凹末端的异源双链分子,在 Taq-DNA 聚合酶的作用下,产生含重叠序列的双链 DNA 分子。这种 DNA 分子再用两个外侧寡核苷酸引物进行第三次 PCR 扩增,便产生突变体 DNA。有报道为提高 Bam H I 限制性内切酶的活性,用该方法将 BamH I 限制性内切酶的第 54 位半胱氨酸用丙氨酸取代后明显地提高了该酶的活性。大引物突变法是以第 1 次 PCR 扩增产物作为第 2 次 PCR 扩增的大引物,整个过程只需 3 种扩增引物进行 2 次 PCR 反应,可获得突变体 DNA。

(3) 盒式突变。盒式突变是利用一段人工合成的含基因突变序列的寡核苷酸片段,取代野生型基因中的相应序列。这种突变的寡核苷酸是由两条寡核苷酸组成的,当它们退火时,按设计要求产生克隆需要的黏性末端,由于不存在异源双链的中间体,因此重组质粒全部是突变体,其突变效率是很高的。如果将简并的突变寡核苷酸插入到质粒载体分子上,在一次的实验中便可以获得数量众多的突变体,大大减少了突变需要的次数,这对于确定蛋白质分子中不同位点氨基酸的作用是非常有用的方法。特别是对蛋白质中的指定位置的氨基酸残基,进行一系列不同氨基酸残基取代以考察取代效果时,非常有效。彭贵洪用该方法进行了尿激酶突变体的研究,用核酸限制性内切酶 EcoR I 和 Msc I 消化处理 DNA,去除含有部分野生型序列的 DNA 片段后,用一段含有基因突变序列的片段取代,发现突变体的功能有明显的提高。

目的基因的定位诱变,与随机诱变一起都是体外基因诱变最常用的方法。定位诱变法对结构比较清楚的基因或蛋白质较为适合,而随机诱变法则对我们了解较少的基因或蛋白质比较适用。后一方法不但对研究对象的基本性质要求较少,还能反过来帮助分析基因或蛋白质的结构,由此

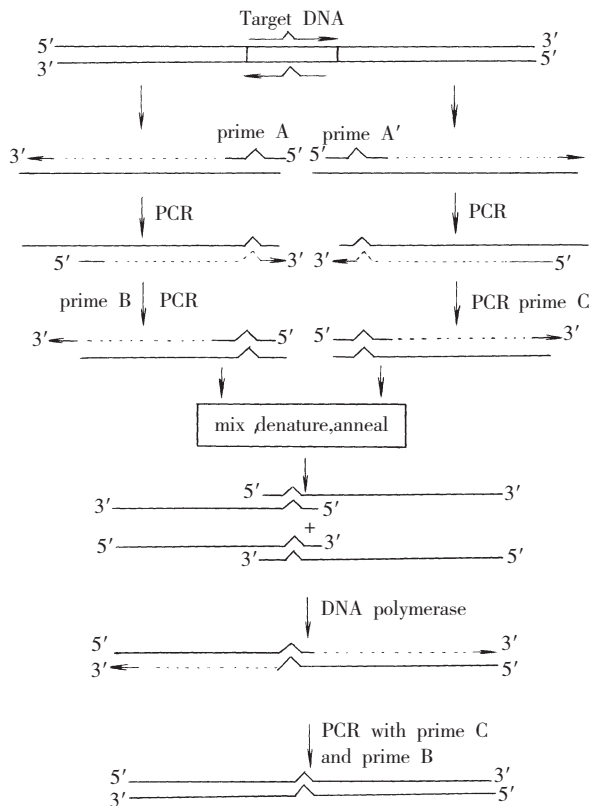


图 6-5 PCR 介导的定点突变

思路发展成分子进化工程技术，大大加快了对生物大分子人工改造的进程。

4. 目的基因的高效表达系统 目的基因表达系统中，以大肠杆菌 (*E. coli*) 系统最为常用，许多原核和真核生物的基因均能在这一系统中实现高效表达。酵母表达系统是真核生物常见的表达系统，除此之外，还有枯草杆菌系统以及高等真核细胞外源基因表达系统等。

在分子生物学方法中出现了一种全新的引入突变的方法，称为 tRNA 介导蛋白质工程，它是在目的基因表达过程中引入突变的方法。该方法是借助校正 tRNA 定点掺入非天然氨基酸，以提供蛋白质结构信息，改进蛋白质检测与分离方法，甚至赋予蛋白质某些新的特性。

五、蛋白质工程的意义与展望

蛋白质工程作为一种新型的强有力的研究手段，对一些基本生物学问题的研究和解决发挥了重要作用。从酪氨酸 tRNA 合成酶开始，该方法已经广泛地运用于研究各种蛋白质的结构与功能、蛋白质折叠和蛋白质分子设计等一系列分子生物学的基本问题。由于基因定位诱变的自如性，使研究工作突破了过去所用方法的局限，使有关研究达到前所未有的深度和广度。

人和动植物几乎所有重要的功能性活动，诸如代谢、运动、发育、生长、思维、记忆、免疫防御、光合作用或固氮作用等，都离不开蛋白质，所以蛋白质工程对揭示生命现象本质和生命活动的规律具有重要意义，与人类的生产和生活密切相关。随着这一领域不断的开拓与发展，大量性能优良的新型蛋白质将被生产出来，并广泛应用于医药、工业、农业和环境保护等方面。正因为如此，世界上各先进国家和重要的工业集团都对这一领域的发展予以高度重视，竞相作为重点项目列入国家的科技发展和研究投资计划中。

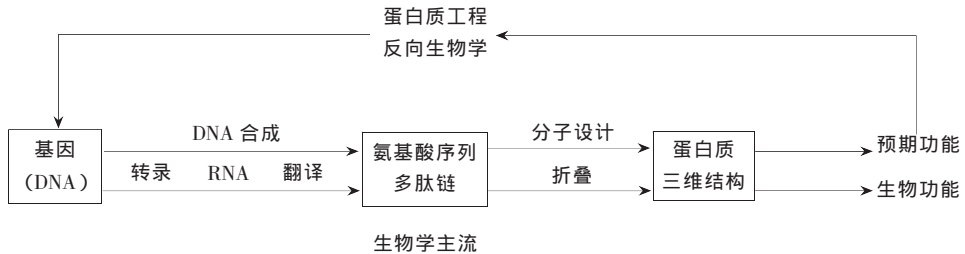


图 6-6 蛋白质工程反向生物学流程

作为第二代遗传工程，蛋白质工程研究为当代生物技术的产业化发展注入了新的生命力。它已经在蛋白质药物改造、酶工程、抗体工程、分子电子器件和新型医学生物材料研制中获得越来越广泛的应用。蛋白质工程面临最大的挑战，也是最振奋人心的目标，是创造自然界中不存在的新蛋白质。

科学工作者已成功地设计并合成了以 α 螺旋和 β 折叠层为主体的简单蛋白质，跨出了人工构建蛋白质的第一步。同时蛋白质工程正在推动一个从预定生物功能到期望的蛋白质结构，再到编码基因及其表达的反向生物学的发展。迄今为止，从基因到蛋白质结构再到生物功能，是分子生物学的中心和主流，它的成就对现代生物学的发展起了巨大作用。由蛋白质工程推动的反向生物

学的深入,对未来生命科学的更大发展可能发挥重大影响。

展望未来,21世纪初的20年间蛋白质工程将处于迅速发展时期,一方面,研究方法和技术将日臻成熟;另一方面,通过与基因工程的密切结合,可望获得一些有应用价值的成果。但作为以改造通过长期自然进化产生的蛋白质为目标的高新技术,蛋白质工程在实用上尚有一系列严重困难有待研究解决,在产业化的方向上将有艰难的历程。蛋白质工程是希望与挑战并存、艰辛与硕果同在的崭新研究领域。

第二节 蛋白质工程与食品加工

蛋白质工程是现代生物技术中最灿烂的领域之一,它将给生物功能的主要体现者蛋白质带来不可限量的发展机遇和前景。以具有催化功能的蛋白质——酶来说,虽然天然酶在生物体内部环境中已经进化到最适应生理功能的状态,但在体外工业化应用时,则存在着不可逾越的稳定性障碍。酶发挥催化作用,对环境条件要求苛刻,极易失活变性,如何提高酶的适应能力成为人们最关心的焦点之一。蛋白质工程技术为这一问题的解决开辟了崭新而有效的途径。酶的催化作用常常被应用于食品加工过程,以增加产量、改善品质、提高效率。如凝乳酶用于生产干酪;葡萄糖异构酶用于制取高果糖浆,还可用于以木糖为底物的乙醇发酵;另外还有溶菌酶、枯草杆菌蛋白酶等。下面主要以葡萄糖异构酶和凝乳酶(原)为例来介绍蛋白质工程在酶蛋白的结构和功能改造中的应用。

一、葡萄糖异构酶

葡萄糖异构酶(glucose isomerase, GI),又称D-木糖异构酶(D-xylose isomerase),系统酶号为EC5.3.1.5,属微生物酶类。1957年最早在嗜水假单胞菌中发现其活性,后来又发现近百种细菌和放线菌能合成该酶;其中绝大多数为胞内酶,只有极少数菌株能分泌胞外酶。葡萄糖异构酶能将D-葡萄糖、D-木糖和D-核糖等催化为相应的酮糖。在体外一定条件下,它也能催化D-葡萄糖转化为果糖,因而成为工业上制备高果糖浆(high fructose corn syrup, HFCS)的关键酶;它还可用于含木聚糖类物质发酵生产乙醇,是一种具有重大经济价值的工业用酶。1967年美国成功地进行了GI的工业化应用,以后西方国家主要的淀粉加工业都转向GI技术生产。各国又竞相利用生物高技术改造GI的结构、性质和功能,以提高该酶的适应性,扩大应用领域。由于葡萄糖异构酶有较好的耐热性,结构也较稳定,使它成为目前国际上公认的研究蛋白质结构与功能关系,建立完整蛋白质工程技术的最好模型之一。

(一) 葡萄糖异构酶的基本性质

葡萄糖异构酶能催化D-葡萄糖异构化生成D-果糖,也可将木聚糖异构化为木酮糖,此外还能以D-核糖、L-阿拉伯糖、L-鼠李糖及葡萄糖3、5、6碳的修饰衍生物为催化底物,但是它只能催化D-葡萄糖或D-木糖的 α -旋光异构体,而不能催化 β -旋光异构体。

葡萄糖异构酶的最适温度一般在70~80℃,最适pH7.0~9.0微偏碱性,不同种属来源的酶有一定的差别。葡萄糖异构酶的最适温度、最适pH及稳定性还受到缓冲液种类、底物浓度、激

活剂、稳定剂及反应时间的影响。另外二价金属离子对酶活力、稳定性及酶的专一性都有影响。

各种属来源的葡萄糖异构酶在结构上都有一定的相似性。其一级结构的同源性随种属关系远近不同而不同。但有 40 个恒定氨基酸残基，其中包括 14 个残基与酶活性中心有关。葡萄糖异构酶晶体的空间结构一般都是紧密的四聚体，单体分子量约 4 万~5 万，单体间符合 222 点对称分布。单体由一大一小两个结构域构成，近 N 端的主结构域是由 8 股右手的 $\alpha\beta$ 型桶构成，两个同轴圆柱中，内柱由 8 条平行的 β -折叠股构成，外柱由 8 股与 β -折叠交替相邻的 α -螺旋构成， α -螺旋与 β -折叠构成反平行；C 端的小结构域由几段 α -螺旋无规则卷曲成一个远离 N 端的环状结构，参与单体内的相互作用及活性部位的构成。其亚基的结构见图 6-7。

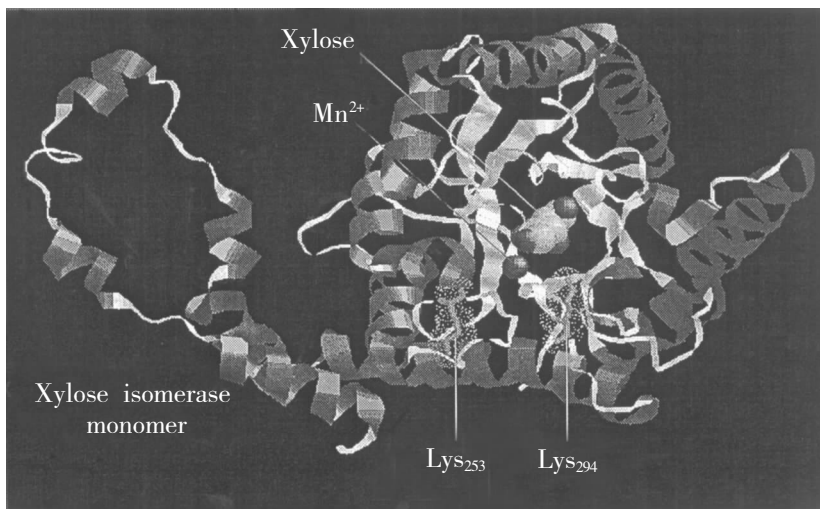


图 6-7 葡萄糖异构酶的亚基结构

葡萄糖异构酶的活性中心位于每个单体平行 β 桶近 C 端的口部，是深陷的口袋状，有两个二价金属离子结合位点，与保守的氨基酸残基侧链基团以及溶剂中的氧原子形成配位键，周围有一个高度疏水背景区，构成的氨基酸侧链不只由一个单体提供，两个单体相聚成无活性或活性微弱的二聚体，只有形成四聚体时才具有全部酶活。葡萄糖异构酶的催化作用采用的是金属离子介导的负氢离子转移机制，可由图 6-8 显示其催化过程。

葡萄糖异构酶的基因组织和调控主要是由木糖操纵子控制。由木糖透性酶基因 (*xyt*)、木糖异构酶基因 (*xyla*)、木糖激酶基因 (*xylb*) 和调节基因 (*xylr*) 构成木糖操纵子的主要成分。我国朱学良、崔虹等人分别成功地对我国自己分离诱变获得的能高效分泌胞外葡萄糖异构酶的淀粉酶链霉菌 (*Streptomyces diastaticus*) M₁₀₃₃ 菌株的 GI 基因进行了分子克隆及在 *E. coli* 中的高效表达。王玉珍等人测定了该酶基因的全序列，并由此获得了相应的氨基酸序列，与其他种属来源的葡萄糖异构酶相比较，其一级结构也符合 Bhosale S.H. 等人总结的规律。有 40 个氨基酸具有保守性，保守氨基酸残基与金属离子的结合有关。

(二) 葡萄糖异构酶的蛋白质工程

由于葡萄糖异构酶是工业上从淀粉大规模制备高果糖浆的关键酶，具有重大的经济价值，且

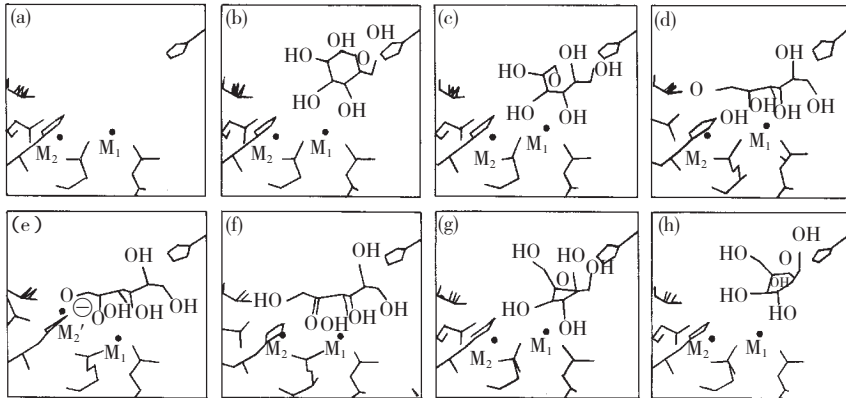


图 6-8 葡萄糖异构酶的催化过程

- a. 酶与二价金属离子 M_1 结合 b. 酶与底物结合 c. 底物开环, C^1 上的氢原子转移到 O^5 上形成 OH^- d. 底物开环的链伸展 e. M_2 位置偏移至 M_2' 发生底物 C^2 至 C^1 间的氢负离子转移
f. 异构化反应结束, M_2 回到 M_2 位置 g. 开环的底物链在 H_{54} 的催化下闭环产生 D-酮糖
h. 酶释放 D-酮糖, 催化过程结束

嗜热菌的 GI 又有较好的热稳定性, 因而嗜热菌 GI 成为国际上研究蛋白质结构与功能关系, 建立完整蛋白质工程技术的最佳模型之一。直接发酵生产的 GI 应用在工业生产中, 已经取得了令人瞩目的成功, 但仍存在一定局限性, 如最适 pH 为碱性、高温下稳定性还有待提高等。偏碱性条件下糖不稳定易焦化, 使总产率下降; 高温条件有利于反应进程的加快和平衡点的向果糖方向移动, 因此对 GI 进行定向改造成为客观迫切的需求, 而蛋白质工程技术, 可在研究 GI 结构-功能关系的基础上, 通过对某些氨基酸的替代和修饰, 改变 GI 的结构性质, 改善其工业应用性能。

我国科学家在研究 SM_{1033} 葡萄糖异构酶基因工程和晶体结构的基础上, 通过分子模拟和结构比较, 进行了一系列定点突变, 以期改变 GI 的最适 pH 和最适温度, 并取得了一定的进展, 表 6-1 列出了几种定点突变对 GI 热稳定性及最适 pH、最适温度等酶学性质的影响。

表 6-1 SM_{1033} 葡萄糖异构酶定点突变及其性质

突 变	性 质
$K_{253}R$	热稳定性小于野生型, 比活是野生型 1.5 倍
$N_{184}V$	比活和热稳定性远低于野生型
$N_{184}D$	最适 pH 下降了 1 个单位, pI 下降了 0.6 个单位, 酶活为野生型的 38.27%
$A_{198}C$	最适温度升高 $8^\circ C$, 酶活为野生型的 86.95%
$Q_{20}L$	最适反应温度下降 $5^\circ C$, 热稳定性为野生型的 78%, 对底物亲和性增强
$G_{247}D$	酶活提高 33%, 最适 pH 下降 0.6 个单位, 热稳定性降低
$G_{138}P$	热稳定性比野生型提高一倍, 最适温度提高 $10\sim 12^\circ C$, 比活与野生型相当
$G_{138}P/G_{247}D$	酶活比野生型提高 45%, $80^\circ C$ 时比 $G_{138}P$ 更稳定

在这些定点突变中, 突变酶与野生型酶比较研究表明, 突变酶 $N_{184}D$ 的最适 pH 下降了 1 个单位, pI 下降了 0.6 个单位, 但酶活性仅为野生型的 38.27%, 相似的突变酶 $N_{184}V$ 的比活和热

稳定性也都远低于野生型。这是因为 Asn₁₈₄ 处于亚基表面，位于活性中心附近但不参与与底物的结合，Asn₁₈₄ 替换成 Asp₁₈₄ 后，在表面引入负电荷，改变了活性中心的静电环境，使活性中心的可解离基团的 pK_a 发生改变，因而 pI 和最适 pH 均发生改变，Asn₁₈₄ 位于活性中心区域的入口处，酰胺化的侧链对热稳定性有负面的影响，但在 Asn₁₈₄ 去酰胺化替换成 Asp₁₈₄ 或 Val₁₈₄ 后，两者都改变了活性中心空间构象，对底物的亲和性发生了改变，降低了活性中心的稳定性，因而对催化活性和热稳定性的负面影响超过脱氨基化反应的正效应。Asn₁₈₄ 突变为 Asp₁₈₄ 虽然可以增加与底物的结合，但结合并不是限制步骤。因此，N₁₈₄D 和 N₁₈₄V 突变酶的热稳定性，催化活力均下降。

突变酶 A₁₈₉C 最适温度提高了 8℃，酶活为野生型的 86.95%。在酶蛋白中引入 Cys 是设想让两个亚基之间形成二硫键以提高稳定性，但实际上两个亚基的巯基（—SH）之间由于存在空间障碍，不能结合形成二硫键。自由—SH 与活性氨基酸残基 Asp₂₅₄ 和 His₂₁₉ 距离较近，可能会影响活性中心氨基酸构成的电荷中继系统，或在溶剂的参与下，在活性中心形成新的氢键，最终影响酶的最适温度，而热稳定性并未改变。

在 Mrabet 研究密苏里游动放线菌葡萄糖异构酶，突变酶 K₂₅₃R 的酶失活半衰期比野生型增加 5 倍，取得了成功。对 SM₁₀₃₃ 葡萄糖异构酶，伍传金等人也进行了类似的尝试，SM₁₀₃₃GI 中 253 位也是 Lys，而 K₂₅₃R 突变酶的热稳定性小于野生型，可能是由于不同种属间的差异造成了四聚体结构的不对称性，使热稳定性下降。

在 SM₁₀₃₃ 葡萄糖异构酶中引入定点突变 Q₂₀L，产生的突变酶对底物的亲和性有所增强，但最适温度下降 5℃，热稳定性为野生型的 78%。可能是 Gln₂₀ 位于 SM₁₀₃₃GI 的 N 端（1~320 氨基酸残基）的 8 段 α/β 型桶状结构域中的 $\alpha_0 \sim \alpha_1$ 螺旋之间，没有任何氢键连接的 Gln 的亲水侧链易破坏 β -折叠结构，非极性 Leu 替换后，可增强 α -螺旋二级结构间的疏水作用，但由于 Gln₂₀ 位于四聚体的表面，疏水侧链取代后使分子表面疏水作用增强，反而不利于蛋白质的稳定性，因此降低了 GI 的热稳定性。

突变酶 G₂₄₇D 酶活比野生型酶提高了 33%，最适 pH 下降 0.6 个单位，但热稳定性只有野生型酶的 61%。从酶的晶体结构来看，Gly₂₄₇ 位于酶活性中心，是 242~247 位氨基酸残基形成的 β -折叠股的最后一个残基，引入 Asp 后电负性极强，改变了分子的静电场分布，影响了活性部位的电荷传递过程，而使酶活性提高，同时导入的负电荷也使得活性中心可解离基团的 pK_a 发生变化，从而使突变酶 G₂₄₇D 的最适 pH 下降了 0.6 单位。G₂₄₇D 酶的热稳定性降低，可从计算机模拟的分子结构中找到原因，Gly₂₄₇ 在本身无侧链基团，柔性较大，引入 Asp₂₄₇ 后，较大的极性的侧链基团，其空间自由度较小，与活性中心的附近 N₂₁₆、R₂₁₉、D₂₅₄ 和 D₂₅₆ 残基侧链产生空间位阻的障碍，因过于拥挤而相互排斥，影响 β -折叠的稳定性；加之 Asp₂₄₇ 接近于亚基表面，也可能影响亚基间相互作用的稳定性，这些都会导致酶热稳定性降低。

G₁₃₈P 突变酶是 SM₁₀₃₃ 葡萄糖异构酶蛋白质工程中最成功的定点突变。G₁₃₈P 突变体的酶活与野生型相当，而其最适反应温度提高 10~12℃，其失活半衰期约是野生型 GI 的 2 倍。从它分子空间结构上分析原因发现，Gly₁₃₈ 是靠近酶分子表面位于一段无规则卷曲的转折处，接近 136 位与活性中心相关的 Trp，Gly₁₃₈ 替换成 Pro 后，降低了该段无规则卷曲的柔性，计算机模拟显示刚性的 Pro 吡咯烷环侧链恰好能够充填 G₁₃₈P，由于无侧链基团而留下的空洞，自然的完成肽

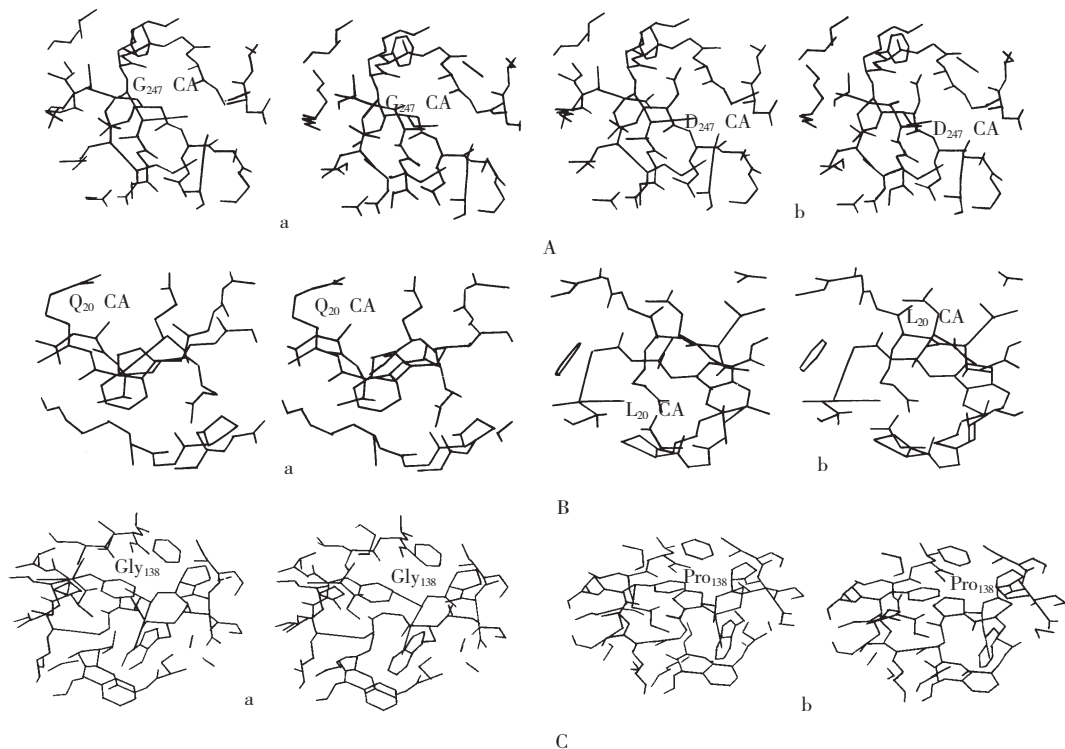


图 6-9 野生型 GI 和突变体酶的立体结构

A. G₂₄₇D B. Q₂₀L C. G₁₃₈P a. 野生型 b. 突变体

链转折,使得整个分子结构更加紧密稳定。通过分析比较已知的其他种属 GI 氨基酸序列发现,除高温嗜热菌外,该同源位置氨基酸均为 Gly,而嗜热高温菌同源性部位则为 Pro,恰恰是它的热稳定性和最适反应温度都是最高。Pro 较小的转动自由度以及刚性的吡咯烷环使得 β -转角或无规卷曲结构更加稳定,从而稳定整个蛋白质的空间结构,提高蛋白质的热稳定性。这一现象在其他多种酶中都能发现,如 1,6-寡葡糖苷酶、Trp 合成酶、鸡腺苷酸激酶等。在蛋白质工程中,用 Pro 替代其他氨基酸 (X-aa \rightarrow Pro) 也有许多应用,如 T₄噬菌体溶菌酶、丝氨酸蛋白水解酶、中性蛋白酶等。

王玉珍等人在总结前述单定点突变的基础上,采用双突变法获得突变 SM₁₀₃₃葡萄糖异构酶 G₁₃₈P/G₂₄₇D,其热稳定性在 80℃ 时比 G₁₃₈P 更高,而酶活比野生型酶提高 45%,最适温度和最适 pH 均有改善,是蛋白质工程技术集各种优势突变于单一工程菌产物的成功范例,具有较高的实际应用价值,在 1999 年已取得中国国家专利。

葡萄糖异构酶的点突变蛋白质工程对酶的专一性也有影响,表 6-2 列出了一些突变体酶对葡萄糖和木糖的催化常数。由表中可见野生型的 GI 对木糖的催化作用比对葡萄糖大,不同的突变酶其酶的选择性不同,双突变 W₁₃₉F/V₁₈₆T 和 W₁₃₉F/V₁₈₆S 的酶底物专一性均有利于葡萄糖的异构化反应。

表 6-2 定点突变 Gl 底物专一性的影响

突变酶	Kcat/Km (min ⁻¹ nM ⁻¹)	
	葡萄糖	木糖
野生型	5.8	97.2
W ₁₃₉ Y	6.0	3.2
W ₁₃₉ F	1.5	13.6
V ₁₈₆ T	9.7	55.4
V ₁₈₆ S	5.7	15.9
W ₁₃₉ F/V ₁₈₆ T	32.9	21.6
W ₁₃₉ F/V ₁₈₆ S	12.4	4.0

注：本表摘自陆兆新讲座。

二、凝乳酶

凝乳酶 (chymosin) 是利用生物工程技术发酵生产的食品工业用酶之一, 早在 1990 年就已获美国 FDA 批准用于干酪生产, 且符合 GRAS (Generally Recognized As Safe) 标准, 无需标示。凝乳酶也是研究蛋白质结构修饰与功能之间关系的良好材料。

自 20 世纪 80 年代以来, 各国均成功地研究了凝乳酶的基因工程表达, Marston 和 Kawaguchi 研究了凝乳酶原基因在大肠杆菌中的表达水平; Uozumi 和 Beppu 的发酵产率达到 13.6mg/L 发酵液; Mellor 等人实现了在酵母细胞中表达, 1990 年 Strop 实现在 *E. coli* 中表达并积累于包含体改善了提取条件。我国张渝英利用 Tac 启动子构建的牛凝乳酶原 B 基因表达质粒 pTaAC 转化大肠杆菌 JM₁₀₅, 在对数期加入诱导剂 IPTG (isopropyl-β-D-thiogactose) 0.1mmol/L 能明显诱导凝乳酶活性, 而温度升高有利于 *E. coli* 包含体的形成。因此在 42℃ 无 IPTG 条件下基因也能表达, 用 ELISA 法测定可获凝乳酶原产量 80~100mg/L, 变性、复性且酸化后可获得有活力的凝乳酶 14~20mg/L。王革等人为提高表达水平, 同时避免使用价格昂贵的 IPTG 诱导剂, 用 P_rP₁ 启动子代 Tac 启动子, 并研究 5' 端、3' 端旁侧序列对表达的影响。结果表明 Shine-Dalgarno 序列与 ATG 之间的长度以及核糖体结合部位 RBS 附近 mRNA 稳定的二级结构与表达有关; 翻译终止密码子 TGA 与转录终止子 rmBT₁T₂ 之间的茎环结构以及茎环结构所处的位置也与表达有关。Geoffrog 等人还报道了编码牛凝乳酶的基因在乳酸克鲁维酵母 (*Kluuyveromyces lactis*) 中表达成功, 并且能有效地分泌到胞外。

凝乳酶的蛋白质工程主要集中在对二硫键的研究上。不同来源的凝乳酶有不同数目的二硫键。牛凝乳酶含有三对, 米黑毛霉含有两对, 寄生内座壳菌只有一对。因此不同二硫键在凝乳酶中对酶活性的影响是不同的, 利用蛋白质工程中的定点突变技术可以了解二硫键在结构、功能中的作用。

黄葵等人研究了牛凝乳酶的结晶性质, 并对二硫键进行化学修饰研究。他们比较了酶变性前后二硫苏糖醇 (DTT) 对二硫键的还原作用的差别。发现牛凝乳酶的三对二硫键中, 有一对是在酶分子表面, 不用变性处理即可被还原; 而另两对二硫键则在变性以后才能被还原, 因而可能处在酶分子内部。经过溴化氰降解法对二硫键进行定位研究的结果表明: 分子表面的一对二硫键

是 Cys₂₅₀-Cys₂₈₃，该二硫键被还原后引起活力下降 25%；如用其他方式修饰该二硫键，如用碘乙酸、氯化汞等，酶活力也下降 25% 左右。比较不同来源凝乳酶显示 Cys₂₅₀-Cys₂₈₃ 二硫键是保守的。因此认为凝乳酶中 Cys₂₅₀-Cys₂₈₃ 二硫键是维持酶活性所必需的。

1997 年，唐兵利用定点突变法研究了 Cys₄₅-Cys₅₀ 二硫键的三种突变体 C₄₅D、C₅₀S 以及 C₄₅D/C₅₀S 凝乳酶原的复性率，以考察 Cys₄₅-Cys₅₀ 二硫键在酶分子正确折叠中的作用，结果发现三种突变体复性条件、活化条件均基本一致，因而具有类似的折叠特征与空间结构，可以说明错配二硫键是影响复性的主要因素。氨基酸残基的取代没有从根本上影响肽链的正确折叠。三种突变体中双突变酶 C₄₅D/C₅₀S 复性率比野生型低而比单突变体 C₄₅D 和 C₅₀S 高，说明虽然缺失一个二硫键使复性过程中二硫键错配的机会减少，但该二硫键的缺失，使凝乳酶原多肽链在折叠过程中形成的某些中间体较野生型不稳定而发生错误折叠，即使折叠正确也不稳定，而容易丧失活力，因而双突变体获得有活性产物比野生型少。在单突变体 C₄₅D 和 C₅₀S 中，Asp₄₅ 与 Cys₅₀ 之间以及 Cys₄₅ 与 Ser₅₀ 之间的相互作用比 Asp₄₅ 与 Ser₅₀ 之间相互作用更弱。使折叠中间体产物更不稳定，正确折叠率更低，所以唐兵认为 Cys₄₅-Cys₅₀ 二硫键的形成使凝乳酶原折叠中间体及产物较稳定，有利于凝乳酶原多肽链的正确折叠。张渝英也研究了 Cys₄₅-Cys₅₀ 二硫键的定点突变，得到了类似的结果。

陈红杰等人对凝乳酶原（凝乳酶）中第三对二硫键 Cys₂₀₆-Cys₂₁₀ 也进行了定点突变研究，五个突变体在 *E. coli* 的高效表达中，除 C₂₀₆A 外，C₂₁₀A、C₂₀₆A/C₂₁₀A、C₂₁₀S 和 C₂₀₆S/C₂₁₀S 四个突变体表达量均为细胞总蛋白的 50% 左右。突变酶的复性率与野生型的比较见表 6-3。

表 6-3 凝乳酶原突变体及其野生型复性率比较

突变型	复性率 (X ± SD) (%)
野生型	26.9 ± 1.5
C ₂₀₆ A/C ₂₁₀ A	14.5 ± 1.0
C ₂₀₆ A/C ₂₁₀ S	3.26 ± 0.50
C ₂₁₀ A	0.72 ± 0.42
C ₂₁₀ S	0.45 ± 0.39
C ₂₀₆ A	0

注：本身引自陈红杰等。

从表中可以看出：C₂₀₆A/C₂₁₀A 的复性率分别是 C₂₀₆S/C₂₁₀S、C₂₁₀A、C₂₁₀S 的 4.5 倍、20 倍、30 倍，C₂₀₆A 完全不能复性。C₂₀₆A/C₂₁₀A 复性率高达野生型的 50%。说明 C₂₀₆-C₂₁₀ 二硫键不是正确折叠所必需的，双突变复性率优于单突变体，且不同氨基酸残基取代复性率不同。说明 206 与 210 位的氨基酸残基对凝乳酶原的有效折叠起重要作用。比较分析突变酶与野生酶的远紫外 CD 光谱和荧光光谱以及酶的比活，发现 C₂₀₆A/C₂₁₀A、C₂₀₆S/C₂₁₀S 与野生型凝乳酶原三者有相似的空间构象，满足催化活性的要求，突变分子只是某些 Trp 残基微环境受到微扰。牛凝乳酶原中三对二硫键的空间位置及其对酶分子性质的影响见表 6-4。

唐兵等人为进一步阐明影响凝乳酶原分子再折叠的主要原因，用蛋白质二硫键异构酶（protein disulfide isomerase, PDI）和 GSH/GSSG 对重组、复性进行比较研究。结果表明，二硫键的错误配对是影响凝乳酶原正确折叠的主要原因，减少二硫键错误配对的机会就能有效地提高其复

性率。

表 6-4 牛凝乳酶原二硫键的性质作用

二硫键	位置	贡 献
C ₂₅₀ -C ₂₈₃	分子表面	维持酶活性所必需
C ₄₅ -C ₅₀	分子内部	有利于折叠中间体及产物的稳定有利于多肽链的正确折叠
C ₂₀₆ -C ₂₁₀	分子内部	不是正确折叠所必需的,但对折叠的有效性起重要作用

黎红晔等人对凝乳酶第二个发夹结构中Ⅵ型 β -转角L²⁰G T P P Q²⁵的功能,利用定点突变技术进行了研究,三个突变体L²⁰G G Q²⁵、L²⁰S G Q²⁵、L²⁰G S Q²⁵中前两种的牛凝乳酶原表达质粒及野生型均能在*E. coli*中表达,突变体产物也均能自活化为假凝乳酶,复性后的理化性质也与野生型类似,但水解酪蛋白活性两者均明显低于野生型。该现象说明,突变对酶原的折叠影响不大,也不影响对酪蛋白的亲和力,但都显著降低酶的催化效率,这与T.L.Blundell实验室对凝乳酶第五个 β -转角的研究结果相类似。说明这两个 β -转角在凝乳酶的功能中都起重要作用。

三、其他分子蛋白质工程

(一) 胰岛素的蛋白质工程

胰岛素是一种蛋白质激素,是治疗糖尿病的特效药,具有重要医用价值。天然胰岛素用于临床有一些重要缺点,包括作用时效短、进入血流缓慢、长期使用产生抗性、长期保存易变性、供应短缺等。通过对胰岛素的蛋白质工程研究,可以获得上列缺点得到改善的新型胰岛素制剂。我国的相关研究人员密切合作,取得下列一系列研究结果。

①改造胰岛素原连接肽(C肽),从30几个氨基酸缩短为3个氨基酸,获得基因工程生产胰岛素的高效表达,已进入中试,并获得国家专利。

②依据药用胰岛素制剂的精细结构,提出增加次级键、稳化寡聚体以获得长效胰岛素的原理,通过定向分子设计获得2种目标产品,作用时效延长8~12h。在0.2nm分辨率测定目标产品的晶体结构,证实分子设计原理的正确性。首次在国内成功地实现从预定性能→分子设计→目标产品制备→改性产品的结构测定的蛋白质工程全循环,为进一步的研究奠定了基础,提供了经验。

③以速效和高效胰岛素为中心,完成定向分子设计12种,获得4种目标产品,成功地达到预期目标。

④建立了工程化胰岛素结构-功能研究的多种系列,包括长效、速效、高效、高稳定、低免疫等改性胰岛素,形成了一个比较系统的多方位研究格局,为我国胰岛素蛋白质工程的进一步发展、创新和临床应用提供了充分条件。

(二) 胰蛋白酶抑制剂

通过蛋白质工程途径研究慈姑双头蛋白酶抑制剂和南瓜族的天花粉蛋白酶抑制剂的结构与功能,取得显著成绩。

①确认抑制剂的活性中心和二硫键的作用。慈姑双头蛋白酶抑制剂由179个氨基酸所组成,

含有 2 个活性中心，是一多功能的蛋白酶抑制剂，能抑制多种蛋白酶，其组分 A 能同时抑制一分子胰凝乳蛋白酶，而组分 B 能同时抑制二分子胰蛋白酶，根据抑制剂活性中心的一般规律及对慈姑抑制剂化学修饰的研究结果，确定该抑制剂的活性中心定位于 Lys-Ser (44~45) 及 Arg-Tyr-Lys (76~78)。随后，将慈姑抑制剂 B 的基因构建于 pVT_{102u/a} 表达质粒，并在酵母中进行表达，纯化后的表达产物经鉴定与天然的一致。在此基础上对抑制剂 B 的基因进行突变，44 位的 Lys 突变为 Ala，纯化后的该突变体具有明显的弹性蛋白酶抑制剂活性，同时还保留一半的胰蛋白酶抑制剂活性，因另一 Arg 活性中心的活性未受影响。同样，若将 76 位的 Arg 突变为 Ala 也得到同样结果。这就进一步证明，慈姑抑制剂的活性中心分别位于 Lys (44) 及 Arg (76)。

慈姑抑制剂有 3 对二硫键，其中 Cys-Cys (43~89) 组成一大环及 Cys-Cys (139~148) 组成一小环，在此小环中另有一对 Cys-Cys (141~144) 二硫键，若将此对二硫键分别突变为 Ala (141) 及 Ser (144)，该突变体仍保留抑制剂的全部活力；说明此小环中的一对二硫键并非抑制剂活性所必需。若将此一对二硫键保留，而将小环的 Cys-Cys (139~148) 分别突变为 Ala (139) 及 Ala (148)，抑制剂活性也保留不变。说明抑制剂小环的两对二硫键中任意去掉一对，均不影响为维持抑制剂活性所必需的构象。

②改变抑制剂的专一性。确认专一性相关残基。葫芦科植物栝楼块根天花粉胰蛋白酶抑制剂 (TTI) 由 27 个氨基酸残基所组成，含 3 对二硫键，活性中心 P₁ 位于第三位的 Arg，将 TTI 基因同样构建于 pVT_{102u/a} 质粒中，并在酵母中表达，能成功地获得重组 TTI。若将 Arg (3) 突变为 Leu (3)，则 TTI 不再具有对胰蛋白酶的抑制活力，却有一定程度抑制弹性蛋白酶的活性；若突变为 Ala (3)，则具有明显的弹性蛋白酶抑制剂活性，若将 P₁ 与 P₁' 位的残基进行双突变，即 P₁ 位的 Arg→Ala，P₁' 位的 Ile→Ser，此双突变体是一很强的弹性蛋白酶抑制剂，能等当量抑制弹性蛋白酶。上述结果表明，P₁ 残基决定抑制剂的专一性，而 P₁' 残基将影响抑制活力的强弱。

(三) 枯草杆菌蛋白酶

枯草杆菌蛋白酶是广泛用于洗涤剂工业中的一种重要酶。蛋白质工程的主要目的是通过酶分子改造获得抗氧化、稳定性并能高表达的碱性蛋白酶。经过几年的努力，已获得很好的结果。一方面，用定点诱变方法先后通过突变 Met₂₂₂Ala、Gln₁₀₃Arg、Asp₆₀Asn，使碱性蛋白酶抗氧化性达到 95% 以上，并提高酶的比活 2~3 倍。另一方面，用 PCR 法对蛋白酶基因进行随机突变，通过表型筛选得到热稳定的碱性蛋白酶，热失活半衰期比野生型延长 3~6 倍。在 65℃ 的高温下，半失活时间长达 82min。由此获得了既抗氧化又耐热的碱性蛋白酶。热稳定的碱性蛋白酶基因的 DNA 序列测定发现，突变 Asn₁₁₈Ser 是热稳定性增加的主要原因，这一结果迄今尚未见有报道。这不仅对该酶应用范围的扩大具有意义，而且对其结构-功能关系提供了新的了解。这一研究结果已经获得国家专利。

(四) 天花粉蛋白的蛋白质工程

天花粉蛋白 (trichosanthin, TCS) 是从栝楼块根中分离纯化的一种活性蛋白，属 I 型核糖体失活蛋白。TCS 最早用于中期引产，对治疗恶性葡萄胎、滋养层细胞疾病等有较好疗效。它还有广谱的抗病毒作用，能抑制人艾滋病病毒 (HIV-1) 在受感染细胞中的复制，可望用作抗艾滋病药物。但天花粉蛋白作为外源毒蛋白，在体内引起免疫应答，导致过敏反应。蛋白质工程试

图通过对 TCS 进行结构与功能的改造,降低 TCS 的免疫原性。已经通过测定突变体蛋白与单抗 TET 结合能力的改变,发现在残基 173~177 之间的突变体明显降低了与单抗 TET 的结合能力,从而推测 173~177 位残基附近可能是单抗 TET 的结合部位。同时,对于活性部位附近具有恒定氢键并在一级结构上保守的残基进行了定位诱变试验,以了解它们对活性部位构象及生物活性的影响,对这些突变体生物活性及酶动力学测试表明,它们与野生型相比变化不大。对突变体 Q₁₅₆A 和 R₂₂L 的晶体结构测定显示,虽然突变残基与天然残基显著不同,但 TCS 分子活性部位的构象基本上保持不变。这为进一步的分子设计提供了参考信息,即某些活性部位的保守残基也是可替换的。

(五) 溶菌酶

溶菌酶的蛋白质工程主要应用于“工程二硫键”提高该酶的热稳定性方面。以 T₄溶菌酶的研究较为深入。晶体结构研究表明,T₄溶菌酶分子含一条肽链,并折叠形成两个在空间上相对独立的结构域,活性中心位于两个结构域之间。该分子含 97 位和 54 位两个未形成二硫键的半胱氨酸,即野生型酶不含二硫键。二硫键是稳定分子空间结构最重要的一种共价键,它能将分子牢固地联结在一起,因此它能提高酶的热稳定性。Perry 对溶菌酶空间结构仔细分析并提出对其热稳定性改善设计方案,采取通过定位突变,使溶菌酶半衰期由原来 11min 提高到 6h。如果同时用碘乙酸封闭余下的第 54 位 Cys 或将其突变为 Thr 或 Val,则同时提高该酶的抗氧化活力。新引入的“工程二硫键”稳定了两个结构域的相对位置,从而稳定了由两个结构域所形成的活性中心。

(六) 蛋白质分子设计及其新方法研究

蛋白质工程实际上包含分子工程和分子设计两大部分,所有通过分子工程实现的分子改造目标都是在合理的蛋白质分子设计的基础上进行的。显然,蛋白质分子设计是蛋白质工程的重要一环。我国在研究和发蛋白质分子设计及其定量方法方面,取得了一系列具有创新意义的成果,简述于下。

①酶与底物、药物与受体结合自由能及稳定性的计算机模拟。通过模拟野生型与突变体(G₁₆₉A)枯草杆菌蛋白酶与底物结合自由能之差,模拟柔红霉素及其类似物与 DNA 片段 d(CG-TACG)形成嵌合性复合物时结合自由能之差,以及模拟野生型和突变体(N₂₁₈S)枯草杆菌蛋白酶的稳定性的改变,证明分子动力学加热力学积分方法计算自由能是分子设计的有力工具,同时指明,目前尚不能把自由能模拟视为研究蛋白质稳定性的可靠工具,并对国际上这一领域中存在的一些问题进行了指正。这一系列研究结果已在国际上引起重视。

②蛋白质及其周围溶剂的静电相互作用的计算机模拟。以 BPTI 为对象,改进了微观的蛋白质-偶极朗之万-偶极(PDL)模型。用有限差分法和边界元方法根据宏观的连续介质模型模拟蛋白质可解离基团的 pK_a 值,以及突变体中可解离基团的 pK_a 值的改变,模拟结果与实验结果相符。同时,将宏观的连续介质模型与微观的 PDL 结合,模拟了蛋白质的氨基酸残基的溶剂化能。

③多肽及蛋白质的随机动力学模拟。用随机动力学模拟的方法,研究了溶剂效应对环状 10 肽环孢霉素 A 的溶液构象与动力学的影响,预测了枯草杆菌蛋白酶的空间结构,并尝试运用广义朗之万方程代替布朗运动方程的随机动力学模拟方法取得初步成功。

(七) 蛋白质结构预测和模型构建

蛋白质工程研究中建立了以神经网络计算预测蛋白质二级结构的方法,取得成功率优于60%的好成绩,并进一步运用简化的二态蛋白质分子能量函数预测同源蛋白的三级结构,预测精度(预测结构与实验测定结构 C^α 原子位置间的均方根差)可优于1nm。对于同源性较差(在30%~60%之间)的蛋白质,运用改进的四态能量函数,也取得了良好效果。在改进同源蛋白质模型建造方法的基础上,还建立了一套蛋白质三维结构的同源模型建造(modeling)计算机软件PMODELING。该软件系统分成主链模型建造、侧链模型建造和质量评估三大部分7个模块。通过对25族100个同源蛋白的模型建造检测,其主链均方根偏差对近缘残基为0.7~0.8nm,对远缘残基为1~1.2nm。该系统与目前流行的商品软件(HOMOLOGY, COMPOSER)相比,具有精度高、操作自动化程度高和运行时间少的优点。

第三节 分子进化工程及其在食品中的应用

一、分子进化工程

(一) 分子进化工程的概念

在38亿年漫长的生物进化过程中,产生了各种各样的生物类型,同时也产生了多种多样的生物分子,决定着生物的类型及其生理功能。达尔文进化论思想将生物的多样性归结于随机的基因突变和自然选择,其进化系统中的各种产物在所有的水平都有表现,从生命的多样性到单独的生物分子。所谓分子进化工程(molecular evolution engineering)就是在试管中进行“分子的进化”,是在实验室试管中将达尔文思想在核酸、蛋白质等分子水平上的快速延伸和应用。它通过人工合成或借助于生物表达的手段,人为制造大量突变,然后按照特定的需要和目的,给予选择压力,将满足期望的、适合特定目的分子筛选出来,从而实现试管中生物分子的进化。

分子进化研究不仅可以了解自然界生物进化的分子机理,推动生命科学的理论研究,还发展成为应用研究的一个新学科——分子进化工程,获得以前尚未发现的、或者自然界还不存在的新功能分子,促进生物技术及其产业的发展。所以诺贝尔奖获得者 M.Eigen 曾预言:“试管中进化是生物工程的未来”。

(二) 分子进化工程的产生和发展

分子进化工程的形成与发展归功于固相化学的成就和组合思想在化学和分子生物学中的应用和发展,它是一个崭新的领域。1963年 Merrifield 首次提出固相合成的概念,克服了传统的液相合成的种种弊端,为合成化学带来了生机。20世纪60年代和70年代,固相合成化学稳步发展,特别是肽化学,由于生物体20种天然氨基酸结构相似但又有区别,而且容易获取,是理想的固相合成构件,并且发现很多天然小肽有生物活性,在很多生理和药理过程中起重要作用,如酶抑制活性、免疫促进活性、抗肿瘤活性等,所以肽的合成化学很早就受到重视,渐渐发展成熟。利用化学合成的方法合成随机序列组合肽库(peptide library),并筛选含有大量异质性的短肽库,除了用20种天然氨基酸作为构件外,还可以引进D-氨基酸等非天然氨基酸,使肽库更加丰富和多样性,选择的余地更大。

从组合库的合成方法看，20 世纪 80 年代中期，出现了 Geysen 的“针头法”和 Houghten “茶袋法”的肽库的化学合成方法，拉开了肽库及其他组合库化学合成的序幕。近年来，出现了利用大量有机小分子作为构件，合成具有特定结构功能的小分子库。建组合库方法也越来越多，先后出现了分离合成法、光导平行合成法、一珠一化合物法、重复解旋法等新方法和新技术。化学合成组合库技术渐趋成熟，化学组合库的构件范围大大扩大，应用也越来越广泛。如化学合成肽库应用于抗原决定簇的分析鉴定、阿片样肽的鉴定、抗微生物肽的研制开发、酶抑制剂的开发和蛋白质亲和配体的筛选应用等。

1985 年，Smith G.P. 利用基因工程手段将一段外源肽序列展示 (display) 在丝状噬菌体的表面，开始了肽库的生物合成。1988 年他们又将合成的随机序列寡核苷酸片段克隆到丝状噬菌体，表达后每个丝状噬菌体粒子表面展示一种多肽，所有这些展示不同肽段的噬菌体构成噬菌体展示肽库。通过亲和筛选，得到与特定蛋白质结合的结合肽。由于表达的肽与编码基因直接关联，活的噬菌体繁殖扩增后极其容易分析目的克隆的结构。另外，在肽库合成方法上也有很大的进展，除了用丝状噬菌体作为表达载体外，噬菌粒、核糖体等都用来展示外源片段。不仅展示小的片段，抗体以及小的蛋白质片段等大分子也能在噬菌体表面获得展示。这些随机肽库被应用于确定单克隆抗体抗原表位、分析酶作用底物、寻找大型功能蛋白的小分子模拟肽等。

20 世纪 80 年代蛋白质工程作为新的学科出现了。它是基因工程、蛋白质结构学和计算机技术相结合发展起来的。它标志着人类可以按照自己的意愿和需要来改造蛋白质，甚至设计出自然界中原来不存在的全新蛋白质。通过定点突变改造蛋白质基因，特别是酶基因的改造，取得了相当大的进展。但总的来说，我们的能力并未达到对复杂的生物体系进行有效人为改造的水平。90 年代初，易错 PCR (error-prone PCR)、DNA 序列改组 (DNA shuffling) 等技术的应用，建立基因突变库，在对目的基因表型有高效检测筛选系统的条件下，尽管不了解蛋白质的结构信息，仍能获得具有期望特性的新基因及其蛋白质 (酶)，基本实现了蛋白质的人为快速进化。

表 6-5 分子进化工程的发展

年 份	里 程 碑
1984	多针法合成有限肽库
1985	茶袋法合成有限肽库
1986	重复方法构建筛选多针系统固相合成肽库
1986—1990	多聚核苷酸库的研究和开发
1988	分离合成法液相合成有限肽库
1988	噬菌体展示肽库的构建筛选
1990	光导平行合成法合成肽库
1990	丝状噬菌体展示肽库的构建和应用
1991	一珠一化合物肽库的合成与筛选
1991	重复方法液相肽库的合成和应用
1992	基于苯丙二氮杂草的有限小分子库合成
1993	易错 PCR 酶基因的突变
1994	DNA 序列改组酶基因的进化
1997	易错 PCR 和 DNA 序列改组相结合的进化

注：本表参照田波等的《分子进化工程》。

现在,几乎所有跨国大制药集团都成立了分子进化工程或组合化学研究开发小组,还成立了许多以分子进化工程技术为依托的新公司,也有新创立的专业期刊《分子多样性》(Molecular Diversity)。新技术、新方法不断发明,这一崭新的领域正在快速发展,获得了许多成果,期望成为新的生物技术产业。

(三) 分子进化工程的原理

分子进化工程的显著特点是分子的多样性和进化的快速性。生物大分子核酸和蛋白质的基本结构是核苷酸和氨基酸,这些结构类似而又不完全相同的分子——构件以不同顺序的排列组合可以得到的核酸和蛋白质分子。生物和生物分子的多样性就是这些分子在一级结构上分子构件的大量不同的排列组合的体现。如果将一定长度上这些构件的所有可能顺序的排列组合的分子都合成出来,那么,这些所有可能的分子全体就组成了该长度的随机序列组合库。理论上组合库中分子数目是相当巨大的。假定每一步反应可以应用的构件为 X 种,库中每个分子含有 Y 个构件,那么库中随机序列组合的分子总数 $N = X^Y$ 。如用 4 种碱基合成编码六肽(18 个碱基)的寡核苷酸库,就有 $N = 4^{18}$ (69×10^9)。根据 DNA 兼并密码子的性质,其中含有的基因数为 $(4 \times 4 \times 2)^6$,即为 1.07×10^9 。在蛋白质和多肽的场合,有 20 种天然氨基酸,如果酶由 100 个氨基酸组成,那么 20^{100} 种的排列与组合的蛋白质。合成化学和分子生物学的发展已能将这些随机构件如核苷酸、氨基酸或其他有机小分子,通过一定的方法连接起来,组成含有大量不同结构的随机组合分子库或随机突变基因库。组合库中囊括的一定长度上所有构件的排列顺序,也就是这一长度的所有可能的突变,这些突变可能是自然界中已经发生过的或正在存在或已经淘汰的,也可能是自然界中尚未存在或即将发生或很久以后会发生的。因此,在实验室中通过合成这些突变分子库或将这些突变分子在细胞中、噬菌体表面表达,然后筛选或选择人们期望的分子类型,快速地进化这些分子。

物种的进化需要经历一个漫长的过程。它是物种的性状在产生自然突变后,按照“适者生存,不适者淘汰”的自然规则,通过几万年,几百万年或更长的筛选过程而逐步进化到现存的物种。这些物种仍然在不断的进化过程中,但自然的进化速度非常缓慢。而利用分子进化工程,可以在短短的几周内或几个月内创造出在自然条件下需要漫长的岁月才能创造的大量突变,然后根据人们所期望的目标,在一定的选择压力下,筛选出具有高活性的或稳定的蛋白质、多肽、或具有一定亲和力的目的分子。这种模拟的分子进化,不仅可以在短时间内获得人们期望的具有生理活性、特定功能的分子,作为研究试剂和药物先导化合物、工业催化和食品生产的酶制剂、功能性食品的添加剂等,而且通过对这些分子的结构和功能分析,有助于在分子水平研究核酸、蛋白质以及其他生物分子的作用机理、相互识别的机理和生物进化的机理。

分子进化工程技术包括 3 个阶段:①将各种构件(氨基酸、寡核苷酸、基因片段等)随机组合起来构建大容量的组合库;②在一定的选择压力下,对某一特定生物功能活性的高效筛选;③活性成分的分析鉴定。

(四) 分子进化工程的构成和类型

根据建库方法,组合库分为分子生物学库和化学合成库。分子生物学库是通过人工合成随机序列的 DNA 片段或连接突变的天然的 DNA 片段,应用基因工程手段克隆表达其产物。主要以噬菌体展示库(如肽库、抗体库和小蛋白库)和微生物中表达如杂交蛋白基因。化学合成库是用

多种化学合成的方法构建和筛选组合库，如肽库、寡核苷酸库（特别是 RNA 库）和有机小分子库等。

采用不同的构件构建不同类型的组合库决定了在不同水平的分子进化。目前，将组合库分成肽库、抗体库、蛋白质库、核酸库和有机小分子库等，因而可以进行各种水平的分子进化。

1. 多肽水平的进化 通过噬菌体展示蛋白和化学合成肽库的构建，从随机肽库中筛选出与蛋白或其他分子的特异结合肽、配体肽等，用于抗原-抗体反应分析、酶作用底物分析，功能性肽、抗菌肽以及酶抑制剂的开发。

2. 抗体水平的进化 利用噬菌体展示抗体、抗体片段、单链抗体等抗体库的构建，筛选人们所需的抗体，用于医疗诊断、药用试剂和药物等。

3. 蛋白质水平的进化 根据表达载体的不同分为 2 种类型：①利用噬菌体展示蛋白，将蛋白的某一功能区引入突变或随机序列，构建容量巨大的随机分子库，从中筛选出具有特定结构和功能的新型蛋白。②利用酶基因的突变，同类酶基因片段的重组，构建某个酶的随机基因突变库，通过基因操作的方法使这些基因在微生物中表达，筛选出人们所需的蛋白质和酶，也称为酶的定向进化（directed evolution of enzyme）。这是近年来在酶工程领域中发展很快的研究领域，有望使酶的稳定性、活性得到提高，使工业酶类的应用更加广泛，并创造一些特殊的酶类。

4. 核酸水平进化 通过化学合成和（或）PCR 方法构建容量巨大的随机序列单链核苷酸（DNA 和 RNA）库，从中筛选出许多靶分子，包括核酸结合蛋白如聚合酶、转录因子等，以及有机小分子如 ATP、茶碱等高亲和力配体。筛选高亲和力寡核苷酸结合配体可以应用于基础研究试剂以及诊断与药物。

5. 有机小分子进化 利用化学合成的方法构建和筛选非肽寡聚体和寡聚小分子库。这些小分子分子量低、蛋白酶水解抗性强、或本身就是芳香环结构等适于用作药物的结构和分子，是理想的药物筛选源。世界上许多公司投入巨资构建和筛选有机小分子库，已广泛用于受体拮抗剂、酶抑制剂的研制与开发。

（五）分子进化工程的应用前景

传统的酶工程技术改良酶的稳定性、提高酶活性和改变酶的特异性等可通过物理化学诱变，或酶的化学修饰和固定化。目前，随着分子生物学和基因操作技术的发展，酶基因的克隆、酶基因的定向突变成为可能，使酶的改良技术又有新的发展，这就是酶分子的进化。至 1999 年为止，应用酶分子定向进化技术已经成功地改良了近 30 种酶。如通过 DNA 序列改组法使天冬氨酸氨基转移酶的活性提高了 10^5 倍；通过易错 PCR，使枯草杆菌蛋白酶的活性提高了 500 倍。因此，酶分子进化工程将会在酶的工业应用，如食品、医药、环境和轻工等领域将会发挥巨大的作用。

在药物筛选方面，传统的药物筛选是根据特定的药物生理功能从植物、动物或微生物的发酵液提取或合成大量的化合物，然后鉴定其生理活性。这种提取、分离、纯化和鉴定需要很长的时间，长的要好几年。而采用分子进化工程技术则会大大加速筛选过程，使药物的发明、发现周期缩短。如从六肽库中筛选到阿片受体抗体，对戒毒有重要意义；从九肽库中筛选到高度抑制草鱼出血病毒的多肽；从环状肽库中获得与促红细胞素（EPO）受体结合的环状肽，其结合活性比 EPO 高数倍。随着技术的完善，分子进化工程技术作为新药研制的手段非常具有吸引力。目前，世界上众多的公司投入了巨大的资金，目的是利用分子进化工程技术加速药物的筛选过程。分子

进化工程已经广泛用于治疗癌症、爱滋病、心血管病、神经性疾病等的药物筛选和研制，并已经获得了大量的受体拮抗剂、酶抑制剂，一些有希望的药物先导物已进入临床前期研究，不久将进入临床实验。

分子进化工程是一个新兴的学科，已展现出巨大的魅力和潜在的应用前景，相信在 21 世纪一定会对科学技术和国民经济的发展做出重要的贡献。

二、酶分子进化工程

随着酶学研究的不断深入和酶工程的发展，工业用酶越来越多，应用面也越来越广。但人们在使用过程中也注意到酶有一些不足之处，如：①稳定性较差，在高温、pH、金属离子、有机溶剂等的存在下，容易变性失活；②有些酶的活性较低，转化反应慢，难于工业化应用等。因此，人们不断地设法来改善这些不足之处，如采用固定化酶技术、酶的化学修饰技术、蛋白质工程技术等，近几年又开始了酶定向进化工程。

在生物细胞中的酶的特性如稳定性、低活性、高（低）特异性等也是细胞正常生理代谢的需要，是生物进化到某一阶段最佳的选择。如果我们改变某一酶的特性，对于该生物来说，是扰乱了它正常的生理代谢。另一方面，生物在漫长的进化过程中，酶的进化并非一定是提高酶的稳定性、提高酶的活性。所以，目前科学家进行酶分子定向进化的大多是为了酶的工业应用，因此希望进化的酶能提高稳定性和活性，改变酶的特异性等，能够在工业上发挥更大的作用，如延长酶使用时间和缩短加工过程来降低成本。因此，许多人认为目前进行的酶分子进化是定向的进化，是向人类需要的方向进化，而不是适合于生物细胞本身需要的进化。所以也称酶定向进化工程。

在分子进化工程技术中，多肽水平进化、抗体水平进化等将会在功能性食品的开发、食品卫生、食品安全和食品检测中有潜在的应用前景。在农产品加工、食品生产加工中酶分子的进化工程更具有应用可能性，特别是酶分子进化工程技术的迅速发展，已经给人们展示了良好的应用前景。因此，将着重介绍酶分子进化工程的技术和方法。

（一）酶分子进化的基本步骤

典型的定向酶分子进化实验的步骤有 6 个。

1. 选择目的基因 根据酶改良需要，选择酶的基因。既可选择一种基因，也可选择同类（family）的若干种基因。

2. 构建基因变异库 通过各种方法，如点突变（point mutagenesis）、易错 PCR、DNA 序列改组等，使基因产生变异，构建基因突变库（组合库）。这个阶段是酶分子进化技术中最基本和重要的阶段。

3. 变异基因与表达载体连接 用基因工程的方法把基因突变库的各种变异基因与表达载体（vector）连接起来。

4. 克隆基因向宿主的转导 将连接各种变异基因的表达载体分别转导到宿主（微生物）中，培养，使基因表达，产酶。

5. 筛选进化的基因 对微生物所产目的酶的活性等进行测定，确定变异基因是否在目标特性上有些改良（定向进化），筛选出符合带有目标特性基因的细胞。

6. 分离改良的基因 将筛选到的符合人们需要的、上述微生物的基因分离出来,再进入下一步的进化工程的循环。

经过上述多次进化过程反复循环,多次累积改良结果,最后得到满足人们目前要求的酶基因。

(二) 构建基因突变库的方法

构建一个适当程度分子多样性的基因突变库是酶定向进化成功的关键。基因突变库的创建有两种途径:点突变和体外重组(in vitro recombination)。

1. 点突变 大多数随机点突变可以创造单个碱基的突变,但由于遗传密码的同源性,一个碱基的突变并不会使 19 个氨基酸发生变化,而只有 6 个左右的氨基酸发生变化,这样显著减少了分子多样性。

虽然目前存在着许多点突变的方法,如易错 PCR 和化学诱变剂介导的随机突变,但在酶分子进化中比较实用的是易错 PCR,这是因为易错 PCR 方法简单、快速和廉价,最重要的是突变频率能精确控制。

(1) 易错 PCR (error-prone PCR)。所谓易错 PCR 是指在 PCR 体外扩增基因时使用特定条件,使扩增的基因出现少量碱基误配,引起突变。通常使用的易错 PCR 方法是由 Leung 等提出的,然后由 Cadwell 和 Joyce 等进一步发展。易错 PCR 是创造随机突变的有效方法,通常降低一种 dNTP 的浓度(降至 5%~10%),使 PCR 易于出错,达到随机突变的目的;还可以加入 dITP 来代替被减少的 dNTP, dITP 的导入,又会使下一轮 PCR 循环中出现更多的错误。易错 PCR 的突变率还可以通过调整在反应液中 Mn^{2+} 的浓度来简单地控制。在 PCR 缓冲溶液中加入 0.5mmol/L Mn^{2+} ,有利于提高突变率。在不同的反应条件下,易错 PCR 的突变率可达到 0.11%~2.0%。

用易错 PCR 法进行点突变关键在于突变率的控制。一般而言,有意义的突变只占极少数,而有利突变和不利突变组合在一起又将酶失活。另外,突变率太高不利于发现有用突变株,而突变率太低则出现的大多是野生型。一般认为,理想的突变率为每个目的基因的碱基替代在 1.5~5.0 个左右。

(2) 化学诱变剂介导的随机突变。体外随机诱变也可在 65℃ 下直接用羟胺处理带有目的基因片段的质粒,然后用限制性内切酶切下突变了的基因片段,在克隆到表达载体中进行功能筛选。

2. 体外重组 (in vitro recombination)

(1) DNA 序列改组 (DNA shuffling)。DNA shuffling 即将同类突变基因库,或结构同源性的若干基因用 DNA 酶 (DNase I) 或限制性内切酶切成的片段,使这些片段在重新排列过程中产生随机突变。该法最早是由 1994 年,Stemmer W.P.C. 提出的。他用 DNA 序列改组完成 β -内酰胺酶 (β -lactamase) 的分子进化,提高了该酶的活性。该突变体在抗生素头孢噻肟 (cefotaxime) 中的生长的最低抑制浓度由野生型的 0.02 μ g/mL 增加到 640 μ g/mL,即提高了 32 000 倍。

另外, DNA 序列改组不仅可以改变一个酶的基因,对于执行同类功能的不同来源酶的基因也可一起进行改组,从而得到原先在自然界中并不存在的酶,有人称为 homologous shuffling 或者 family shuffling。如 Stemmer 等用来源于弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)、阴沟肠杆菌

(*Enterobacter cloacae*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 和肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的头孢霉素酶基因进行序列改组, 突变体对 moxalactam 的抗性增加了 270~540 倍, 而单个基因序列改组的结果, 仅增加了 8 倍 (Stemmer 1998)。对于前者的研究表明, 102 个氨基酸来自弗氏柠檬酸杆菌, 142 个氨基酸来自阴沟肠杆菌, 181 个氨基酸来自小肠结肠炎耶尔森氏菌, 196 个氨基酸来自肺炎克雷伯氏菌。

DNA 序列改组是模仿自然进化的一种 DNA 体外重组的方法。这种方法不仅可对一种基因人为进化, 而且可以将具有结构同源性的几种基因进行重组, 共同进化一种新的蛋白质。DNA 序列改组基本过程包括四个步骤: ①目的基因片的准备, 根据不同的需要选择一个基因或其片段, 也可以是几个序列上具有较高同源性的基因。②DNase I 酶切, 将这些基因随机切成约 10~50bp 或 300bp 左右的小片段。③基因片段重组, 在不加引物但有 Taq 酶的条件下进行 PCR, 将切割的基因片段随机连接起来。在这个过程中可能会发生许多突变和重组, 形成突变库。④筛选或选择, 筛选正突变, 得到的正突变又可重复进行 DNA 序列改组, 使目标性状进一步提高。

DNA 序列改组具有以下有用的特征: ①可以利用现存的有利突变, 快速把不同的有利突变积累到同一突变体中; ②重组可伴随点突变同时发生; ③可以删除个体中的有害突变和中性突变。只有采用 DNA 序列改组, 将过量的野生型 DNA 与突变体 DNA 回交, 才能删除突变体中含有的中性突变; ④为了得到几个特性同时得以改善的突变体, 可利用正突变之间的序列重组。如活性增高的突变可在一种筛选条件下进行, 同时, 在另外的筛选条件下检测稳定性、溶剂中的耐受性、表达水平或其他特性的提高。

但是, DNA 改组过程中伴随的较高点突变频率会严重阻碍群体中已经存在的正突变组合的发现。由于绝大多数突变是有害的, 有利突变的重组和稀少有利点突变会被有害突变的负背景所掩盖。例如, 具 0.7% 的突变率的 DNA 改组将在含有 1470bp 的 pNB 基因中产生 10~11 个点突变, 这远远高于定向进化的最佳突变频率, 即每个基因中产生不超过 3 个碱基的突变。实际上, 当对四种进化的 pNB 酯酶基因用 Taq DNA 聚合酶进行重组时, 90% 的克隆在筛选时不表现活性。为了降低背景的突变频率, 在片段再组装过程中使用一种具有校正功能的 DNA 聚合酶——pwo 或 pfu 酶所进行的 DNA 改组, 所伴随的点突变频率仅为 0.05%, 使得 80%~95% 甚至更高的克隆有活性, 增加了重组突变体出现的频率。只有重组过程的突变频率很低, 才能保证包含有利突变的重组体不会在有害突变的背景中淹没。

(2) 随机引导重组 (random-priming recombination, RPR)。1998 年, Arnold, F.H. 提出了替代 DNA 序列改组的一种有效的新方法——随机引导重组 (RPR)。RPR 操作过程包括了 3 个步骤。

①随机引导基因片段的合成: 用随机序列的引物来合成互补于模板 DNA 或 mRNA 序列不同区域的大量的 DNA 短片段。由于碱基的错误掺入 (misincorporation) 和错误引导 (mispriming), 这些 DNA 的小片段中也因此含有低水平的点突变。模板既可用单链 DNA, 也可用双链 DNA 或 mRNA。由于这一步骤不经过热循环, 所以不必使用耐热 DNA 聚合酶或 RNA-DNA 聚合酶 (RNA-dependant DNA polymerases)。

②基因片段的重组与扩增: 在热稳定的 DNA 的聚合酶作用下, 经反复的热循环可重新组装成全长的基因。DNA 小片段之间可以相互同源引导和重组。为了增加全长基因的数量, 再经常

规 PCR 进一步扩增这些序列。

③克隆和筛选：将这些变异的基因克隆到表达载体上，根据人们期望的目标进行筛选。

如果一次 RPR 并没有获得人们期望的基因，可以进行下一循环的 RPR，直至达到目标为止。

与 DNA 序列改组相比，RPR 技术具有以下优点：A. RPR 可直接利用单链 DNA 或 mRNA 作模板。B. DNA 改组利用 DNase I 随机切割双链 DNA 模板，在 DNA 片段重新组装成全长序列之前，DNase I 必须去除干净。一般说来，RPR 技术使基因的重新组装更容易。C. 合成的随机引物长度一致并缺乏序列的偏向性 (sequence bias)，保证了点突变和交换在全长的后代基因中的随机性。D. 随机引导的 DNA 合成不受 DNA 模板长度的影响，这给小肽的改造提供了机会。E. 所需亲代 DNA 比 DNA 改组所需的量少 10~20 倍。

(3) 交错延伸技术 (staggered extension process, StEP)。1998 年，Arnold 等人又建立了一种新的体外重组方法——交错延伸技术。首先选择两个亲本基因，然后使它们变性成单链。用一个引物，在 DNA 聚合酶催化下，引发两条模板序列延伸，随后是反复循环的变性和极度缩短的退火相结合，使基因逐步延伸。在每一循环中，不断延长的片段根据序列的互补性与不同模板退火，并进一步延伸。这样重复直到全长序列形成。由于模板的不断转换，大多数多核苷酸含有不同亲本的序列信息。纯化这些突变基因，再通过常规的 PCR 扩增这些基因，并克隆到表达载体上，根据人们期望的目标进行筛选。该技术已成功地重组了由易错 PCR 产生的 5 个热稳定的枯草杆菌蛋白酶 E 的突变体，得到了热稳定性进一步提高的重组酶。

虽然构建基因突变库有很多方法，但这些方法并非相互独立的，既可单独使用，也可联合使用，联合使用会收到更好的突变效果 (表 6-6)。为了更有效地提高突变和进化效果，新的构建突变库方法也正在不断地开发，如 Wilson 等的双循环方法 (double-cycle method) 和酵母 *in vivo* 重组。

3. 筛选或选择 一般来说，建立和进行筛选或选择改良突变体的方法和操作是最费时和费钱的工作。在有了突变文库之后，筛选或选择的条件能确定蛋白质进化的方向，因此建立高效的选择或筛选的方法是影响酶 (蛋白质) 进化成功的关键。

一个有效的筛选战略的先决条件应该是：①筛选方法应该足够快，以至于能够在有限的时间内，从大量的菌落中找到所需突变体。其方法至少一天中能筛选几百个，最好几千个。因此，利用机器人的 96 孔和 384 孔的高效率筛选方法正在被应用于酶的定向进化，它能鉴定出酶对底物的特异性、热稳定性、对映体选择性及其他特定性状等。另外，最好不需酶的纯化就可筛选。②因为仅单个氨基酸的替代很少出现很大的改良，而定向进化常常是通过改良性状几代的累积才能成功，所以筛选必须精确和正确，足以使改良的突变能鉴定和逐步累积。③所筛选的酶表型 (phenotype) 必须确实地同基因型相吻合。这表明改良的基因序列结合到寄主细胞，并表达出改良的酶。

在一般的选择过程中，一个执行期望功能的酶常常直接同寄主有机体的存活和繁殖相联系，如利用抗药性可以选择降解抗生素的酶，耐热性可以在高温下选择，而没有这种酶的细胞在含有抗生素的平板上或在高温培养时不能存活。这种选择可以是一种非常有效的方法，它可以选择含有 $10^6 \sim 10^7$ 的蛋白质突变文库。然而实际上，由于大多数我们所改良的功能并非直接同细胞的存

活有关,而是一些数量的性状,对突变文库通常进行筛选,特别是一些改良性状产生可见的信号时,简单的肉眼筛选方法也可应用。如利用酶反应产物的显色反应,细胞分泌的酶在平板上产生的水解圈的大小。尽管根据显色或水解圈形成的可见筛选快速高效,但也有明显的局限性,因为它是非定量的,对性状的微小变化不够灵敏。高通量 96 孔板适合自动定量筛选。它能迅速地鉴定出酶对底物的特异性、热稳定性、对映体选择性及其他特定性状。

三、酶分子进化的食品及工业应用

在短短的几年中,用定向进化的方法改造工业用酶的成功例子已有几十个,它们在提高酶在非天然环境(如有机溶剂)中的活性、耐热稳定性、非天然底物的特异性、对映选择性及表达水平等方面都有成功。尽管目前通过分子进化的酶在食品上及工业上应用的例子还很少,但从酶分子进化的成果可以看出,酶分子进化将会在食品及工业应用方面有非常广阔的前景。因为,在国际商业酶市场,大约 50% 的酶用于食品加工。

(一) 改变催化特异性

β -半乳糖苷酶是食品加工中一种非常重要的酶。它可以把牛奶中的乳糖分解成半乳糖和葡萄糖,生产低乳糖牛奶不仅增加牛奶的甜味,而且可以减少乳糖对一部分人的不良效应,如腹胀和胀气;另外也可以把乳加工业中的副产物乳糖分解为简单的单糖。在蛋白质工程中,利用原理设计(rational design)来调整酶的底物特异性是非常困难的,而用定向进化则较容易地达到这一目标。Zhang 等(1997)使用 DNA 改组技术改造 β -半乳糖苷酶,其底物特异提高了 1 000 倍,活性提高了 66 倍。

Reetz 等(1997)用易错 PCR 对脂酶基因进行突变,将脂酶水解对硝基-2-甲基癸脂(*p*-nitrophenyl 2-methyldecanoate)的对映体选择性提高了 40 倍。

野生氨基转移酶很难接受 β 分支氨基酸,通过 DNA 序列改组和选择,获得了可以催化 β 分支氨基酸的 *E. coli* 氨基转移酶,而用定点突变则很难改变这一特异性。然后,进行 4 个周期的 DNA 改组和选择,使天冬氨酸氨基转移酶的活性增加了 5 个数量级。

联苯加氧酶(biphenyl-dioxygenase)可通过对多氯联苯的氧化使苯环降解。将来自类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)和洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)的两个基因进行 DNA 改组,这一杂合酶对底物的特异性与两个亲本有所差异,增加了对联苯相关化合物的降解活性;一个重组体表现了对单环的芳香族化合物有新的催化活性。

(二) 提高酶在不同温度的适应性

在一定的温度范围内,各种酶都表现出最高的活性,升高和降低温度都会使酶的活性降低。这种活性-温度的关系在自然或实验室的酶进化过程中都会发生改变。枯草杆菌蛋白酶在食品工业常用的一种酶。通过用易错 PCR 和 DNA 改组的共同处理,枯草杆菌蛋白酶 E 的最适温度范围显著地增加(增加了 17°C),另外在 65°C 时的半衰期延长了 200 倍。

低温酶(cold-adapted enzyme)在食品加工、洗涤剂工业、环境修复和生物合成中有非常大的应用价值。将野生型的枯草杆菌蛋白酶 BPN 进行定向进化,使该酶在 10°C 的活性增加了 2 倍。

通过定向分子进化使枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的 3-异丙基苹果酸脱氢酶的热稳定性得到改善。将 3-异丙基苹果酸脱氢酶基因整合到营养缺陷型的嗜热栖热菌 (*Thermus thermophilus*) 的染色体中, 补充了缺陷基因 *leuB* 的不足, 使该菌株能在最低培养基上生长。在较低的温度下培养, 累积自发突变; 然后, 提高温度选择热温度性突变体。在 3 个周期后, 一个 3-异丙基苹果酸脱氢酶在 70℃ 能生长, 比出发菌株增加了 14℃, 而酶的活性没有发生变化。对氨基酸序列进行了分析, 发现有 3 个氨基酸发生了替代。

(三) 提高酶活性

酶活性提高是工业酶应用的关键所在, 酶活性提高可以减少生产成本, 加快加工进度, 提高生产效率。You 和 Arnold (1996) 使用易错 PCR 提高枯草杆菌蛋白酶 E 的表达水平和在有机溶剂中的活性, 使这酶的总活力提高了 50 倍。广泛用作报告基因的绿色荧光蛋白 (GFP), 经过 3 个循环的 DNA 序列改组, 其荧光强度超过野生型的 45 倍。

Arnold 等对枯草杆菌蛋白酶 E 进行定向进化研究。他在 dGTP, dCTP, dTTP 为 1mmol/L 的情况下, 把 dATP 的浓度降到 0.2mmol/L 进行易错 PCR, 经筛选得到几个在高浓度的二甲基酰胺中酶活性得到提高的突变株, 其中一突变体酶活力提高了 170 倍。Arnold 通过易错 PCR 和 DNA 序列改组, 使大肠杆菌的 pNB 酯酶 (para-nitrobenzyl esterase) 在有机溶剂中的活性提高了 60~150 倍。Liu 等通过对氨酰-tRNA 合成酶的 DNA 序列改组, 酶活性提高了 55 倍。

四、蛋白质进化的理论意义

蛋白质的定向进化不仅在食品工业和医药工业等方面对蛋白质的改造具有重要的意义, 而且它也非常适合于基础理论的研究。对蛋白质分子进化得到的突变体进行分析, 为研究蛋白质结构与功能的关系提供了新的工具。有很多天然蛋白质序列中的差异往往是因为历史事件或随机遗传漂移造成的, 而不是功能性的适应。例如, 从适应不同环境的物种中提取出的蛋白质经常有几十个氨基酸的不同, 其中只有一小部分是与特定功能差异有关的。在实验室的进化实验中, 种系很清楚, 而且突变主要是适应性的。在表型水平上对大量突变体的研究, 有助于人们理解不同特性的相互作用, 以及在自然界中被中性漂移或其他的令人费解的非相关的进化机制所掩盖的相互作用。Anorld 等人使用高保真 DNA 改组成功地区分出基因中的功能性和非功能性突变。

表 6-6 酶分子进化实例一览表

目标酶	改良功能	结 果	突变方法
卡那霉素 核苷酸转移酶枯草杆菌 蛋白酶 E	热稳定性 有机溶剂活性	在 60~65℃ 半衰期 增加 200 倍在 60% 二甲基甲 酰胺	突变菌株 易错 PCR
β -内酰胺酶	对新底物活性	胺中增加 160 倍对头孢噻肟抗 性提高 32 000 倍	DNA 序列改组
枯草杆菌蛋白酶 BPN 对硝基苯甲酰酯酶 (para-nitrobenzyl esterase)	无 Ca^{2+} 稳定性 对 pNB 酶的活性在溶剂中的 活性	半衰期增加 1 000 倍 提高活性 60~150 倍	卡式诱变等 易错 PCR + DNA 改组

(续)

目标酶	改良功能	结 果	突变方法
胸苷激酶	底物特异性	灵敏度增加 43 倍	卡式诱变
β -半乳糖苷酶	对新底物的活性底物特异性	活性增加 66 倍底物特异性增加 1 000 倍	DNA 序列改组
枯草杆菌蛋白酶 E	在溶剂中的活性	总活性增加 500 倍	易错 PCR
砷脱毒途径	砷抗性	砷减少率增加 12 倍	DNA 序列改组
氨乙酰 tRNA 合成酶	tRNA 的氨乙酰	活性增加 55 倍	DNA 序列改组
天冬氨酸氨基转移酶	对分支氨基酸的活性	增加 10 000 倍	DNA 序列改组
脂肪酶	洗涤功能	增加一个循环	诱变 + 体内重组
脂肪酶	对映体选择性	对映体从 2% 增到 81%	易错 PCR
脂肪酶	对长链 p -对硝基苯脂的活性	增加 3 倍	同质基因重组
pNB 酯酶	热稳定性	热稳定性增加 14°C, 在所有温度活性增加	易错 PCR + DNA 改组
酯酶	对映体选择性	对映体从 0% 增到 25%	突变菌株
枯草杆菌蛋白酶 E	热稳定性	热稳定性增加 17°C, 在所有温度活性增加	易错 PCR + DNA 改组
枯草杆菌蛋白酶 E	热稳定性	在 65°C 半衰期增加 50 倍	DNA 改组
枯草杆菌蛋白酶 BPN	在 10°C 时活性	增加 2 倍	化学诱变
头孢霉素酶	对头孢羧氧酰胺 (moxalactam) 的抗性	增加 270~540 倍	同质基因重组
分支酸变位酶	转化成单体酶 (可溶性)	功能性单体酶	寡核苷酸定向密码子诱变
联苯加氧酶	多氯联苯的降解	对难降解底物有活性, 改善了对不同底物的活性	同质基因重组
辣根过氧化物酶	功能表达	活性增加 11 倍	易错 PCR
真菌过氧化物酶	耐热、耐氧化	分别增加 124 倍和 5 倍	易错 PCR + DNA 改组

对定向进化的酶分子结构分析发现, 氨基酸的置换全部出现在酶分子的表面或靠近酶活性位点和底物结合部位的周围。另外, 氨基酸的置换全部位于连接二级结构保守区域之间的可变环上。没有一个有效的氨基酸置换位于直接与底物接触的区段上, 这与预测结果完全不同。这种情况也可能是相邻于底物结合部位的氨基酸的突变是致死的, 仅通过距此位点远一点的氨基酸改变来获得较小的提高。有的酶突变体表达水平提高了, 但比活性却没有改变, 表达水平并不一定是氨基酸序列的一个特征, 而 DNA 序列的改变对表达的转录调控起重要的作用。这进一步说明了准确预测可能改善酶的性能的氨基酸置换是非常困难的。通过定向进化来研究蛋白质的结构与功能的关系, 可为蛋白质工程的理性设计提供理论依据, 更好地发挥理性设计的作用, 实现更准确、迅速地定向改造蛋白质。

主要参考文献

- [1] Ulmer K. M. Protein Engineering. Science. 1998, 219: 666~670
 [2] 王培之主编. 蛋白质工程. 哈尔滨: 黑龙江教育出版社, 1991

- [3] 彭志英主编. 食品生物技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- [4] 王大成. 蛋白质工程. 见: 孟广震主编. 中国科学院生物技术研究进展. 1998. 33~40
- [5] 唐建国, 茹炳根, 徐长法等. 蛋白质工程的研究. 北京大学学报(自然科学版). 1998, 34 (2~3): 342~349
- [6] 顾孝诚. 蛋白质工程研究的十年回顾. 见: 中国生物工程开发中心编. 中国生物技术的崛起. 北京: (内部资料) 1996. 249~270
- [7] 朱国萍, 程阳, 宫春红等. 葡萄糖异构酶的生物工程研究进展. 生物化学与生物物理进展. 2000, 27 (2): 127~131
- [8] 张浩, 毛秉智. 定点突变技术的研究进展. 免疫学杂志. 2000, 16 (4): 108~110
- [9] 陈莉, 金由辛, 王德宝. tRNA 介导蛋白质工程. 生物工程进展. 2001, 21 (1): 11~14
- [10] 陶慰荪, 李惟, 姜涌明. 蛋白质分子基础. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1995
- [11] Bhosale S H, Rao M B, Deshpande V V. Molecular and Industrial Aspects of Glucose Isomerase. Microbiological Reviews. 1996 (6): 280~300
- [12] Zeikus J G, Vieille C, Savchenko A. Thermozyyme: Biotechnology and Structure-function Relationships. Extremophiles. 1998, 2 (3): 179~183
- [13] 贺家明, 付光胜, 侯永勤等. 嗜热链霉菌突变株 M_{1033-9} 产葡萄糖异构酶的研究 I ——菌种分离、诱变及产酶条件. 微生物学报. 1992, 32 (5): 380~382
- [14] 贺家明, 袁建国, 侯永勤等. 嗜热链霉菌突变株 M_{1033-9} 产葡萄糖异构酶的研究 II ——酶的性能与工业应用. 微生物学报. 1993, 33 (3): 187~191
- [15] 崔涛, 谭新宇, 王玉珍等. 7号淀粉酶链霉菌 M_{1033} 菌株产分泌型的葡萄糖异构酶. 科学通报. 1991, 36 (15): 1200
- [16] 崔涛, 刘咸安, 王玉珍等. 产葡萄糖异构酶的链霉菌 M_{1033} 菌株的研究. 微生物学报. 1991, 31 (4): 329~331
- [17] 黄婉治, 王淳, 刘兢等. 链霉菌 M_{1033} 葡萄糖异构酶的分离纯化及其性质的研究. 中国科学技术大学学报. 1992, 22 (3): 283~289
- [18] Xueyang Zhu, Liwen Liu, Maikun Teng et al. Crystal Structure of *Streptomyces diastaticus*. No. 7 Strain M_{1033} Xylose Isomerase. Science in China (Series C). 1996, 39 (6): 636~644
- [19] Jenkins J, Janin J, Rey F et al. Protein Engineering of Xylose (glucose) Isomerase from *Actinoplanes missouriensis* 1. Crystallography and Site-directed Mutagenesis of Metal Binding Sites. Biochemistry. 1992, 31 (24): 5449~5458
- [20] 张公义, 牛立文, 黄婉治等. 链霉菌 M_{1033} 葡萄糖异构酶单晶培养及其初步分析. 科学通报. 1991, 35 (7): 545~547
- [21] 朱学良, 王玉珍, 黄震等. 链霉菌 M_{1033} -D-木糖异构酶的分子克隆. 生物工程学报. 1992, 8 (3): 232~236
- [22] 崔虹, 刘咸安, 李澄清等. 7号淀粉酶链霉菌 M_{1033} 菌株葡萄糖异构酶在大肠杆菌中的高效表达. 高技术通讯. 1993 (7): 9~11
- [23] 王玉珍, 黄震, 戴新华等. 7号淀粉酶链霉菌 M_{1033} 木糖异构酶基因序列分析. 生物工程学报. 1994, 10 (2): 118~123
- [24] 肖亚中, 伍传金, 龙凡等. 用蛋白质工程方法改变葡萄糖异构酶最适 pH 和最适温度. 生物化学与生物物理学报. 1995, 27 (5): 469~476
- [25] 伍传金, 肖亚中, 龙凡等. $K_{253}R$ 和 $N_{184}V$ 点突变对葡萄糖异构酶热稳定性的影响. 生物化学与生物物理学报. 1996, 28 (3): 272~277
- [26] 朱国萍, 罗丹, 蔡云飞等. $Q_{20}L$ 及 $G_{247}D$ 定点突变对葡萄糖异构酶酶活和最适 pH 的改善. 生物工程学报. 2000, 16 (4): 469~473

- [27] 朱国萍, 腾脉坤, 伍传金等. $G_{138}P$ 定点突变对葡萄糖异构酶热稳定性的改善. 生物化学与生物物理学报. 1998, 30 (6): 607~610
- [28] 朱国萍, 腾脉坤, 王玉珍. 脯氨酸对蛋白质热稳定性的贡献. 生物工程进展. 2000, 20 (4): 48~51
- [29] 王玉珍, 徐冲, 朱国萍等. 一种葡萄糖异构酶的 247 位单突变体酶和 138, 247 位双突变体酶及其构建方法. 中国专利 1213003A. 1999-04-07
- [30] 张渝英, 周炜, 刘年娟等. 牛凝乳酶原基因在大肠杆菌中的表达. 生物工程学报. 1991, 7 (3): 195~200
- [31] 王革, 刘年娟, 杨开宇. 牛凝乳酶原基因在大肠杆菌中表达调控的研究. 生物工程学报. 1994, 10 (2): 162~167
- [32] 黄葵, 陈世芝, 杨开宇. 牛凝乳酶的结晶及其二硫键的化学修饰. 生物工程学报. 1991, 7 (1): 77~83
- [33] 唐兵. 缺失 Cys_{45} - Cys_{50} 二硫键的三种突变体凝乳酶原复性的比较研究. 武汉大学学报 (自然科学版). 1997, 43 (4): 527~531
- [34] 陈红杰, 潘学峰, 张国宝等. 凝乳酶原 (凝乳酶) 二硫键 Cys_{206} - Cys_{210} 的定位突变. 生物工程学报. 2001, 17 (1): 7~10
- [35] 唐兵. 影响重组凝乳酶原再折叠的主要原因研究. 武汉大学学报 (自然科学版). 1997, 43 (6): 767~770
- [36] 黎红晔, 张渝英, 董贻诚等. 凝乳酶 β -转角突变体的构建、表达和性质分析. 生物工程学报. 1998, 14 (1): 39~45
- [37] 田波, 李传昭, 孙仑泉等. 分子进化工程. 北京: 科学出版社, 1999
- [38] Gallop M A, Barrett R W, Dower W J, et al. J. Med. Chem. 1994, 37: 1233
- [39] Smith G P. Science. 1985, 228: 1315
- [40] Scott J K & Smith G P. Science. 1990, 249: 386
- [41] Arnold F H & Volkov A A, Current Opinion in Chemical Biology. 1999, 3: 54
- [42] Flickinger M C & Drew S W, Encyclopedia of Bioprocess Technology. 1999, 2: 971, John Wiley & Sons, Inc., NY
- [43] Yano T, S Oue and H Kagamiyama, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 95: 5511
- [44] You L & Arnold F H, Protein Eng. 1996, 9: 77
- [45] Leung D, E Chen and D Goeddel. Technique. 1989, 1: 11
- [46] Cadwell R C & Joyce G F. Mutagenic PCR. Method and Application. 1994, 2: 28
- [47] Taguchi S, Ozaki A and Momose H. Appl. Environ. Microbiol. 1998, 64 (2): 492
- [48] Stemmer W P C. Nature. 1994, 370: 389
- [49] Cramer A, Raillard S A, Bermudez E & Stemmer W P C. Nature. 1998, 391: 288
- [50] Shao Zhixin, Zhao Huimin & Arnold F H. Nucleic Acids Research. 1998, 26 (2): 681
- [51] Zhao H M, Giver L & Shao Z X et al. Nat. Biotechnol. 1998, 16 (3): 258
- [52] Judo M S B, Wedel A B & Wilson C. Nucleic Acids Research. 1998, 26: 1819
- [53] Okkels J S, Thellersen M, Petersen D A et al. Novel Lipolytic Enzyme. 1997, WO 9707202
- [54] Zhang J H, Dawes Glenn and Stemmer Willem PC. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94: 4504~4509
- [55] Reetz M T, Zonta A, Schimossek K et al. Angew Chem. Int. Ed Engl. 1997, 36: 2830
- [56] Kumamaru T, Suenaga H, Mitsuoka M, Watanabe T, Furukawa K. Nat. Biotechnol. 1998, 16: 663
- [57] Zhao H M and Arnold F H. Protein Eng. 1999, 12: 47~52
- [58] Akanuma S, Yamagishi A, Tanaka N, Oshima T. Protein Sci. 1998, 7: 698~705
- [59] K Chen & F H Arnold. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1993, 90: 5618
- [60] J C Moore & F H Arnold. Nat. Biotechnol. 1996, 14: 458
- [61] D R Liu, T J Magliery, M Pasternk & P G Schultz. Proc. Natl. Acad. Sci., U S A, 1997, 94: 10092

生物技术与食品安全和 品质控制

第一节 生物传感器及其在食品 检测分析中的应用

生物传感器是近几十年来，生物学、医学、光学、热力学和微电子技术相互结合和渗透的产物，是一种灵敏、快速、选择性好、抗干扰能力强、响应时间短和检测成本低的小型分析检测仪器。运用它能够对分析样品实现现场检测、连续检测、在线检测，甚至活体分析，因此受到世界各国的关注。目前，生物传感器已较广泛地应用于医学、军事、环保、农业和食品等诸多领域。

一、生物传感器的基本概念

(一) 生物传感器的定义

在定义生物传感器前，先简要地介绍一下什么叫传感器。传感器 (sensor, transducer) 是一种能把一种信号转换成另一种信号以实现信号检测的元器件。被转换的信号通常包括磁、力、热、电、光和化学等信号，这些信号可以转换成声、光、电等信号以便分析和检测。近几十年来，随着微型计算机和微处理器控制技术的发展，传感器通常是将被检测信号转换成电信号以便于计算机处理和分析。从传感器对不同能量进行变换的功能讲，它可以分为光（辐射）传感器、磁传感器、力（压力和加速度等）传感器、温度传感器和化学传感器。其中前四种传感器又统称为物理传感器，以和化学传感器相对应。物理传感器研究、开发和应用得较早，技术很成熟，世界各国都有商品出售。化学传感器指能检测化学量的传感器，第一支化学传感器是 20 世纪初由 Gremer 研制的对氢离子浓度敏感的 pH 玻璃电极。

生物传感器 (biosensor) 是过去 40 年中，以传感器为基础，由生物学、电化学、光学、热力学及计算机等学科相互渗透和融合的产物，是一个典型的多学科的交叉领域。从传感器的角度上讲，生物传感器属化学传感器的范畴，但是过去几十年来的研究、开发和应用，使其成为了一个较为独立的门类，而且发展非常迅速，因此有的学者将生物传感器作为一个单独的类别与物理传感器和化学传感器并列在一起。由于生物传感器是多学科交叉的产物，而且发展迅速，因此关于生物传感器的很多名词尚未统一，有关生物传感器定义的表述也不完全一致，但是关于生物传感器的基本组成单位一般认为包括三部分：①生物敏感元件 (biological sensing element)，又称生物识别元件 (biological recognition element)，它是酶、抗原 (体) 和微生物细胞等具有分子识别

能力的生物分子经固定化后形成的一种膜结构，对被测定的物质有选择性的分子识别能力；②换能器（transducer），又称为转换器，它能将识别元件上进行的生化反应中消耗或生成的化学物质，或产生的光或热等转换为电信号，并且在一定条件下，产生的电信号强度和反应中物质的变化量或（和）光、热等的强度呈现一定的比例关系，从本质讲它就是一种化学传感器；③信号处理放大装置（signal amplification system），它能将换能器产生的电信号进行处理、放大和输出。也有学者认为生物传感器的基本构件仅包括生物识别元件和换能器两部分，而将信号处理放大装置作为生物传感器的附属设备。但是笔者认为，虽然生物敏感元件和换能器是决定生物传感器选择性和灵敏度等特性的核心部分，但是从整体上讲，生物传感器的好坏和信号处理装置的好坏也密不可分，因此笔者更趋向于认为生物传感器应包括生物敏感件、换能器和信号处理装置三部分。据此，笔者认为生物传感器是由固定化的具有分子识别功能的生物材料、换能器和信号处理放大装置组成的分析工具或系统。从上述生物传感器的定义可知，生物传感器是因为其敏感元件来自于生物而得名的，它不是指专用于生物领域的传感器，也不是指被测量必须是生物量的传感器（尽管用它也可以测定生物量）。因此有一类在结构和功能上与生物传感器密切相关的传感器，它能用于测定各种生物参数，但其构成中不含生物敏感材料，故被称为生物敏（biosensing）传感器，不属于生物传感器范畴。

（二）生物传感器的基本组成和分类

1. 生物传感器的基本组成 前面已经讲过，生物传感器的基本组成单位包括生物识别元件、换能器和信号处理放大装置三部分。生物识别元件指的是生物传感器中固定化的酶、微生物细胞、细胞器、抗原抗体和组织切片等具有分子识别能力的生物敏感材料。换能器是指能将在生物敏感材料进行的生化反应产生的各种信息转换成电信号的装置，生化反应中产生的信息不同换能器的种类也不同，表 7-1 列出了生物传感器中生化反应产生的各种信息和所对应的换能器。信号处理装置主要负责信号的分析处理和放大输出。

表 7-1 生物传感器中生化反应产生的各种信息和换能器的选择*

生化反应产生的信息	换能器的选择
离子变化	电流型或电位型离子选择性电极
质子变化	离子选择型电极、场效应晶体管
气体分压变化	气敏电极、场效应晶体管
热效应	热敏元件
光效应	光纤、光敏管、荧光剂
色效应	光纤、光敏管
质量变化	压电晶体
电荷密度变化	阻抗计、导纳、场效应晶体管
溶液密度变化	表面等离子共振

* 参照参考文献 [2] 和 [7]

生物传感器基本的工作原理是，通过生物分子识别作用，生物传感器中的生物敏感材料和生物样品中的待测物质特异性结合，并进行生物化学反应，产生离子、质子和质量变化等信号，信号的大小在一定条件下和样品中被测物质的量存在一定的关系，这些信号经换能器转换成电信号，电信号再经信号分析处理系统处理后输出，反映出样品中被测物质的量。生物传感器的基本

组成和工作原理见图 7-1。

2. 生物传感器的分类 生物传感器通常是根
据生物敏感材料和换能器的种类来进行分类的。
根据生物敏感材料可分为酶传感器 (enzyme sen-
sor)、微生物传感器 (microbial sensor)、免疫传感
器 (immunological sensor)、细胞器传感器 (or-
ganelle sensor)、细胞传感器 (cell sensor)、组织传
感器 (tissue sensor) 和 DNA 传感器 (DNA sen-
sor) 等。根据换能器的不同, 生物传感器可分为
电化学生物传感器 (electrochemical biosensor)、介
体生物传感器 (mediated biosensor)、测光型生物
传感器 (optical biosensor)、测热型生物传感器 (calorimetric biosensor)、半导体生物传感器
(semiconduct biosensor) 和压电晶体生物传感器 (piezoelectric biosensor) 等。现将生物传感器的
分类归纳于图 7-2。

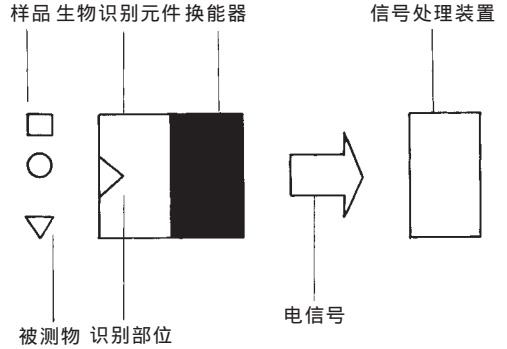


图 7-1 生物传感器基本组成示意图

等。现将生物传感器的
分类归纳于图 7-2。

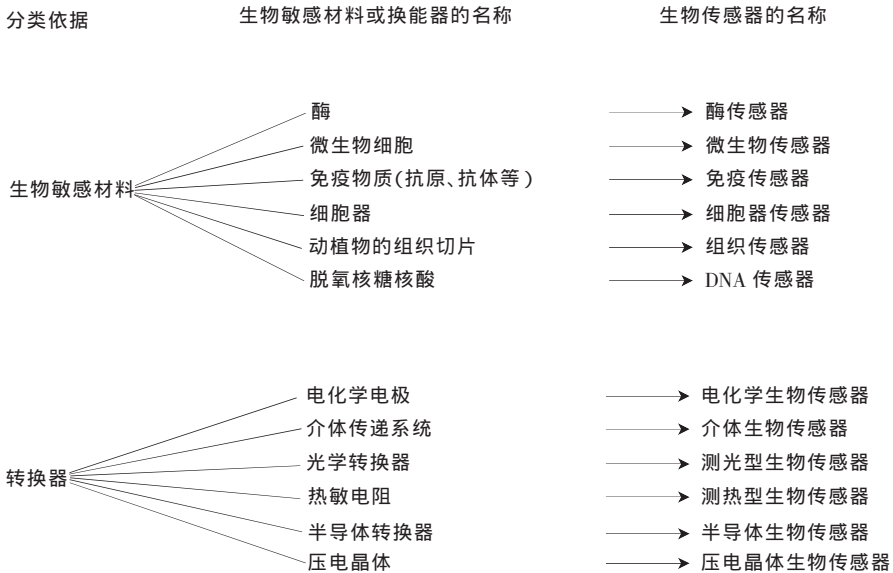


图 7-2 生物传感器的分类

以上两种分类是会相互交叉的, 例如, 酶传感器根据换能器的不同又可分为酶电极 (enzyme electrode)、酶热敏传感器 (enzyme calorimetric sensor) 和酶光极 (enzyme optical electrode) 等等。具体到某一种传感器的命名, 一般是采用“功能 + 结构特征”的方法, 例如, 葡萄糖氧化酶传感器 (glucose oxidase sensor)、BOD 微生物传感器 (BOD microbial sensor) 和葡萄糖氧化酶光纤传感器 (glucose oxidase optical sensor) 等等。

(三) 生物传感器的工作原理

前面非常简要地介绍了生物传感器的基本工作原理, 下面将从生物传感器的分子识别

(molecular recognition)、信号产生和转换 (product and exchange of signal) 以及生物放大 (biological amplification) 等几个方面进一步阐明生物传感器的工作原理。

1. 分子识别 生物传感器中的分子识别简单地讲就是指生物敏感材料中生物分子能选择性地和待测样品中的待测成分进行特异性 (选择性) 结合的性质, 因此生物传感器的分子识别主要是指生物敏感材料的分子识别。如前所述, 生物传感器中的生物敏感材料包括酶、抗原 (体) 等免疫物质、微生物细胞、细胞器、组织切片和 DNA 等。

众所周知, 酶是由蛋白质组成的生物催化剂, 和一般蛋白质不同, 它有一个参与催化反应的活性中心。酶的分子识别指的是酶分子只能和特定的底物分子进行结合, 而不能和其他分子结合的特性。酶分子的识别能力主要是由酶的活性中心决定的。酶的分子的识别能力决定了以酶为生物敏感材料的生物传感器的分子识别能力。

微生物传感器、细胞器传感器和组织切片传感器的分子识别, 从本质上讲也是酶的分子识别, 因为微生物细胞、细胞器和组织切片中进行的生化反应都是在酶的催化下进行的, 但是它们之间也存在一定的差异, 下面以微生物细胞为例进行说明。微生物细胞是一个极为复杂而又完整的生命体系, 数以千计的酶只有在高度协调的情况下才能行使其功能, 因此微生物细胞中的反应和酶促反应之间既有共同之处, 也存在一定的差异。首先, 微生物反应和酶促反应存在很多共同之处, 它们都属生化反应, 都需在温和条件下才能进行; 凡是酶可催化的反应, 含有该酶的微生物也能催化, 而且它们的反应速度接近, 反应的动力模型近似。其次, 微生物反应存在其特殊性, 微生物细胞的膜系统为反应提供了天然的适宜条件, 细胞可以在长时间内保持一定的催化活性; 在多底物的反应中微生物细胞比单纯的酶更适用于作为催化剂; 微生物细胞本身为酶促反应提供了各种辅酶和辅基; 微生物细胞比酶的来源方便和便宜。当然微生物细胞作为生物传感器中分子识别元件也存在一些不足之处, 第一, 微生物细胞在反应过程中伴随着自身的生长, 不容易建立分析标准; 第二, 细胞是多酶体系, 许多代谢途径并存, 难以排除一些不必要的副反应; 第三, 环境条件的变化易引起微生物生理状态的复杂化, 不适当的操作会导致代谢转换现象, 出现不应有的反应。

免疫传感器的分子识别是由传感器上的生物敏感材料——抗原或抗体物质的分子识别能力决定的, 抗原和抗体像酶和底物一样也能发生特异性 (选择性) 结合。有关抗原和抗体的更多的性质请参阅本章第二节的相关内容。

DNA 传感器的分子识别是由 DNA 分子中碱基对的互补结合特性决定的。

2. 生化反应中量的变化和信号的转换 生物传感器中的生物敏感材料完成分子识别后, 接着或同时发生生化反应。生化反应中将伴随一系列量的变化, 如热焓、光、颜色和阻抗等的变化, 运用特定的换能器检测这些量的变化, 并将其转换成电信号是设计各种生物传感器的基础。

(1) 热焓的变化及转换。生化反应中时常伴随有热的变化, 例如大多数酶反应的热焓变化量在 $25 \sim 100 \text{ kJ/mol}$ 的范围内。在酶量和反应条件一定的情况下, 热焓的变化和底物的浓度存在一定的关系, 因此通过测定热焓的变化可以知道底物的浓度。运用热敏元件 (如热敏电阻) 测定生化反应中的热变化, 并将其转换成电信号是测热型生物传感器的设计基础。

(2) 光效应及其转换。有些生化反应能产生光, 运用光学换能器将光效应转换成电信号, 这是测光型生物传感器的理论基础。例如, 过氧化物酶能催化过氧化氢-鲁米诺体系发光, 因此只

要将过氧化物酶膜附着在光纤或光敏二极管的前端，再和光电流测定装置相连就可以测定反应中过氧化氢的含量。

(3) 颜色的变化及其转化。生化反应有时能使一些没有颜色的底物转变为有颜色的产物，也可能使有颜色的底物转化为没有颜色的产物，这些变化都可以引起反应体系光效应的变化，运用光学换能器将这种变化转换成电信号，同样可以测定反应过程中物质的变化。在另外一些情况下，生化反应可能并不引起反应体系颜色的变化，但是可能引起一些在特定波长下有吸收峰的物质（如蛋白质、核酸）量的变化，这种变化同样是设计生物传感器的基础。

(4) 阻抗的变化及转换。生化反应可以将碳水化合物、脂类和蛋白质等分解成酸、碱或盐从而增加反应体系的导电性，从而使阻抗降低；反之，如果生化反应是将小分子的酸碱等物质合成高分子的碳水化合物或蛋白质等，那么反应体系的导电性将降低，使阻抗增加。运用换能器测定阻抗的变化并转换成电信号同样可以测定物质的变化。

(5) 生化反应中其他量的变化及其转化。生化反应中，除了热、光、颜色和阻抗等的变化外，还存在诸多其他量(如质量、气体等)的变化，运用相应的换能器测定这些量的变化并将其转换成电信号也是生物传感器的设计基础。生化反应中常见的一些产物及其对应的换能器见图7-3。

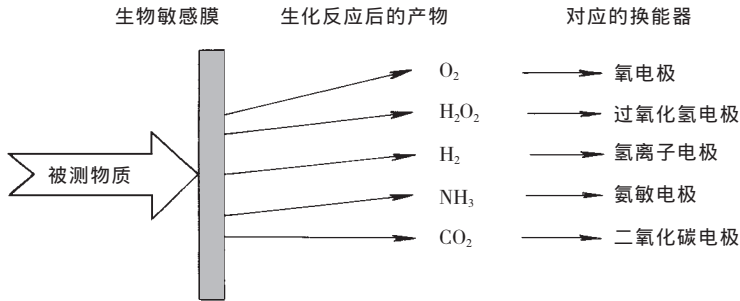


图 7-3 生化反应中常见的产物及其对应的换能器
(引司马立人、蒋中华)

(6) 直接产生电信号。上述几种信号转换是将生物敏感材料与待测物质发生化学反应后产生的物理或化学变化通过换能器转换成电信号，然后通过分析电信号来测定待测物质的量，这种测定方式统称为间接测定方式。还有一类生物传感器是直接测定发生在转换器表面的酶反应中的电子转移或微生物细胞中的电子传递等电信号来直接测定待测物质的量，这种测定方法称之为直接测定方式。图7-4是生物传感器中的一种——酶传

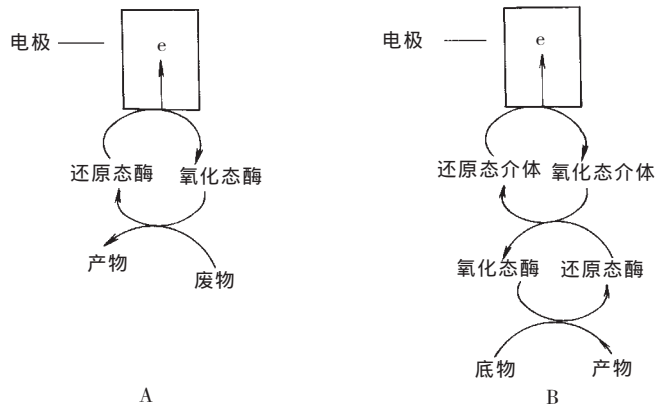


图 7-4 酶电极电信号的产生方式示意图

传感器直接产生电信号的两种方式。图 7-4A 中酶直接固定在电极的表面，酶催化反应中产生的电子直接进入电极；图 7-4B 中酶反应产生的电子通过一种电子传递物质——介体 (mediator) 传递到电极。

3. 生物放大 生物传感器和常规检测的方法最大区别在于，生物传感器能从组成复杂的样品中专一（特异）灵敏地检测所要分析的成分，这一特性是由传感器的结构和组成特征决定的。如前所述，生物传感器的专一性 (specificity) 主要由生物材料反应的专一性所决定的，例如，酶和底物反应的专一性、抗原和抗体反应的专一性等。而灵敏性 (度) (sensitivity)，即最小检出量，则主要取决于生物传感器中换能器的特性、信号分析放大系统的功能和生物材料的生物放大作用等。有关换能器和信号处理系统对灵敏度的影响比较容易理解，那么生物材料是如何通过生物放大来影响灵敏度的呢？所谓生物放大指的是模拟和利用生物体内某些生化反应，通过对反应过程中某些（或某一）产量大且容易分析的物质进行检测，从而判断（推测）反应过程中其他量小或（且）不易检测物质的量的方法。运用生物放大原理设计的生物传感器，可以大大提高生物传感器的灵敏度，从而实现了对分析成分从微克 (μg) 级向纳克 (ng) 级甚至飞克 (fg) 级的飞跃。这里将简要地介绍几种生物放大的机理。

(1) 酶催化放大 (enzyme catalytic amplification)。酶是高效专一的催化剂，它可以在很短的时间内催化大量底物的转化，因此通过测定酶所催化的反应中底物的减少量或产物的增加量可以推测（判断）反应中比底物减少量或产物增加量少得多的酶量，或与酶相关联的其他物质的量，从而实现生物放大作用。应用这一放大原理可以使检测方法的灵敏度（最小检出量）比常规检测方法提高两个数量级。这一生物放大原理在酶联免疫和酶标记核酸杂交中得到了广泛的应用。下面以酶联免疫为例进一步说明酶催化放大的原理。在酶联免疫分析中，酶（常用的酶包括辣根过氧化物酶和碱性磷酸化酶等）首先和抗原（抗体）连接形成酶标抗原（抗体），在分析中酶和对应的底物发生反应产生颜色变化（例如辣根过氧化物酶可以使无色的邻苯二胺底物转化成橘红色的产物），通过测定颜色的变化量，就可以计算出和酶相连接的抗原（抗体）的量。由于酶标抗原（抗体）中的抗原（抗体）可以进一步和其他抗体（抗原）发生反应，因此通过分析酶反应过程中颜色的变化也可以计算出和酶标抗原（抗体）发生反应的抗体（抗原）的量。这一过程可以简单地表示于图 7-5。

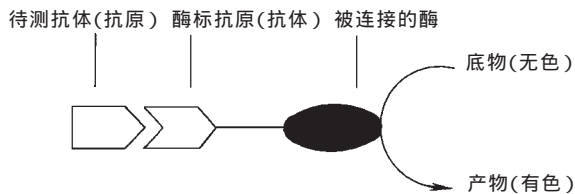


图 7-5 酶联免疫中酶的放大原理示意图

(2) 底物循环放大 (substrate recycling amplification)。底物放大的原理是被测物 S_1 或 S_2 在酶 E_1 和酶 E_2 之间不断循环，每循环一次， E_1 和 E_2 都要分别消耗各自的底物 C_1 和 C_2 ，产生对应的产物 P_1 和 P_2 ，而循环过程中被测物 S_1 和 S_2 的浓度保持不变，通过分析 C_1 和 C_2 的消耗量或 P_1 和 P_2 的增加量就可以测定待测物 S_1 或 S_2 的量，实现放大效应。循环的次数越多酶消耗的底物和产生的产物越多，放大效率也越高。上述底物放大的原理见图 7-6。底物循环放大原理在生物传感器中得到了应用，可将信号放大 4 个数量级。

(3) 酶级联放大 (enzyme cascade amplification)。生物体内的有些酶（通常为酶原）本身是

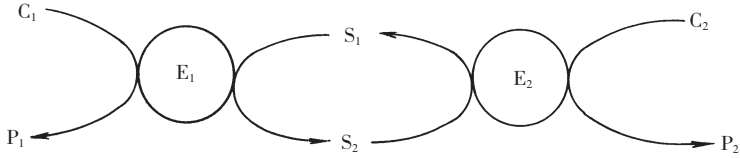


图 7-6 底物循环放大示意图

没有活性的，在辅酶、另外一种酶或酶的变构效应物等激活剂的作用下，酶 E_{1i} 被激活为酶 E_{1a} ， E_{1a} 激活 E_{2i} 成 E_{2a} ， E_{2a} 又激活 E_{3i} 成 E_{3a} ，由于酶是催化剂可以连续使用，这样经过一系列的反应，一个分子的辅酶或变构效应物等激活剂就能够产生成千上万分子的 E_{3a} ，然后 E_{3a} 催化底物 S_3 产生产物 P_3 ，通过测定底物的消耗量或产物的生成量就可以灵敏地测定辅酶或变构效应物等激活剂的量。上述酶级联放大的示意图见图 7-7。

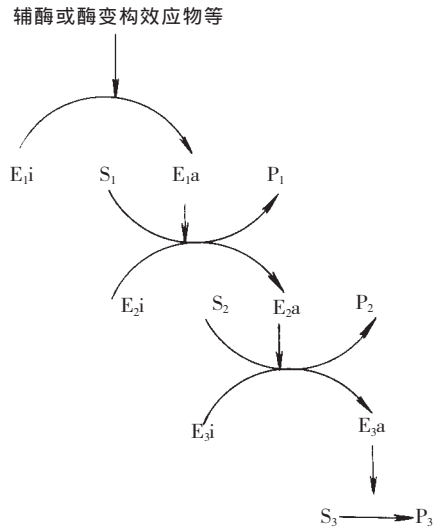


图 7-7 酶级联放大原理示意图

生物体内的激素调节、免疫调节和血液凝固调节等，基本上都是通过酶级联放大来实现信号的快速有效传递。酶级联放大的效率极高，对提高生物传感器的灵敏度极为有效，但是酶级联放大在生物传感器中的应用条件较为苛刻。

(4) 脂质体技术 (liposome technique)。脂质体 (liposome) 是由类似于细胞膜的脂质膜构成的微球体，在微球体的内部包含有被酶、荧光素或电活性物质标记的抗原或抗体等标志物，微球体的外膜上结合有抗原 (抗体)，当外膜上的抗原 (抗体) 与待测的抗体 (抗原) 发生反应，并和补体结合时 (或在表面活性剂的作用下)，微球体破裂，微球体内的标志物被释

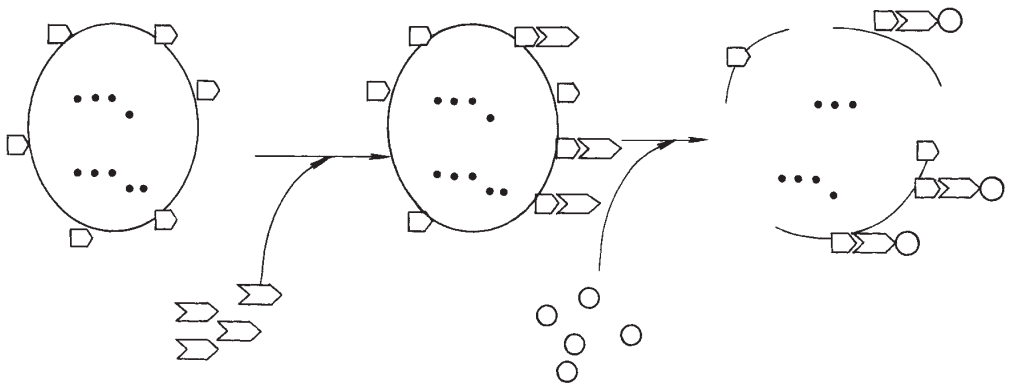


图 7-8 脂质体放大技术示意图

□ 代表抗原 ▷ 代表抗体 ○ 代表补体 ● 代表标志物或表面活性剂

放。由于标志物的量大且容易测定，因此通过测定标志物的释放量就可以测定出待测抗体（抗原）的量，从而实现生物放大。上述过程见图 7-8。

脂质体技术目前还存在着微球体内的标志物容易渗漏和脂质体的稳定性较差等不足之处。

生物放大技术除了上述几种外，还有聚合酶链式反应和离子通道放大效应等等。随着研究的不断深入，将会有越来越多的生物放大技术应用于生物传感器中。

（四）生物传感器的特点

和传统的分析方法相比，生物传感器检测方法具有以下优点。

1. 省时省力，简便快速 由于生物传感器中生物敏感材料反应的专一性（特异性），因此在分析检测待样品中的待测成分时，无需对样品进行分离、浓缩和提纯等过程，大大地节约了人力和物力，缩短了检测时间，分析简便快速。

2. 成本低 在生物传感器中，生物敏感材料是直接固定在换能器上或将生物材料固定在膜材料中后再附着在换能器上，因此它们可以重复使用，这有利于降低检测成本。

3. 不需添加试剂 在生物传感器中由于“分析试剂”——酶和微生物细胞等已固定在传感器上，因此在分析样品时，除了缓冲溶液外无需再添加试剂。

4. 界敏度高 由于生物传感器将生物放大效应和信号的微电子放大功能结合在一起，因此灵敏度高，能对微量的样品进行分析，从而实现微量、痕量、甚至超痕量的分析。

5. 体积小 随着为电子技术的发展，生物传感器的体积越来越小巧，便于携带和使用，从而实现现场分析和检测。目前有些生物传感器还可以植入人体内。

6. 易于实现自动化 生物传感器和计算机联用，易于实现自动化控制。

7. 易于推广普及 和大型的分析仪器相比，生物传感器的成本很低，这有利于推广和普及。

二、生物传感器的发展简史

有关生物传感器的起源可追溯到 20 世纪 60 年代。1962 年 Clark 等将酶液夹在两层透明膜之间形成一层薄液层，然后紧贴在 pH 电极、氧电极和电导电极上，透过膜可以监测到酶液中进行反应，这是生物传感器的雏形。1967 年 Updike 等根据 Clark 等的设想，采用酶的固定化技术，将葡萄糖氧化酶固定在疏水膜上，然后再和氧电极结合，组装成了世界上第一个生物传感器——葡萄糖氧化酶电极。之后，一大批结构类似的各种酶电极相继被报道。但是由于大多数酶的分离纯化非常困难，从而在很大程度上阻碍了酶电极这种生物传感器的进一步的研究和发展。1977 年 Rechnitz 等将固定化的粪链球菌（*Streptococcus faecalis*）活菌体和氨敏电极结合，产生了第一个微生物生物传感器，几乎同时 Janata 等采用固定化的抗体和相应的电极结合首次得到了免疫传感器。随后，细胞传感器、组织切片传感器和细胞器传感器也相继被报道。这期间生物传感器主要是依据生物反应过程中电化学性质来设计的。

20 世纪 70 年代末到 80 年代，由于生物技术、生物电化学和微电子学的不断渗透和融合，生物传感器的设计不再局限于仅仅依据生物反应过程的电化学特性，还可以依据反应过程中光效应、热效应、场效应和质量变化等多种信息来设计更为精密灵敏的各种生物传感器。在功能方面，生物传感器由起初仅能在体外分析测试单一的指标，发展到能在活体（in vivo）测定、多指

标测定和联机在线测定。生物传感器的检测对象已发展到生物体内常见的上百种生物化学物质。生物传感器作为分析仪器已在临床、发酵、食品、化工、农业、环保和军事等领域得到了应用，并显示了较为广阔的应用前景。目前英、美、日、德和瑞典等国家在生物传感器方面有较大的优势。我国的生物传感器研究起步较晚，20世纪80年代初才起步，但是发展速度很快，取得了一大批研究和应用成果，前景喜人。目前生物传感器正朝着微型化、集成化和智能化的方向发展，以生物传感器为重要基础的生物芯片也已问世。

三、生物传感器中生物敏感材料的固定化和成膜技术

生物敏感材料（酶、微生物细胞、抗体和DNA等）是生物传感器的组成核心之一。在生物传感器中，生物敏感材料是以固定化的形式和换能器结合在一起的，因此生物敏感材料必须首先固定化。实际上从生物传感器的定义及其发展简史可以知道，生物传感器是以生物材料的固定化技术为主要的依托技术之一发展而起来的，所以生物材料的固定化在生物传感器的制备中占有非常重要的地位，但是考虑到酶等生物材料的固定化技术在本书的前面已做了详细的介绍，因此，对于固定化技术这里只做简单的介绍。

在生物传感器中固定化的生物材料是以膜的形式和换能器结合的，这样有利于减少响应时间，提高灵敏度。这里所说的膜包括两种形式，一种是酶的生物材料通过吸附作用或化学键在换能器上直接形成的生物材料膜；另一种是生物材料和其他高分子材料结合固定化后形成膜，然后这种膜再和换能器结合在一起。

（一）生物材料固定化技术

所谓生物材料固定化技术是指通过物理或化学的方法将酶、微生物细胞和抗原抗体等生物材料限制在一定的区间内，使生物材料只能在特定的区间进行生化反应，而反应的底物和产物可以自由扩散的技术。和游离状态相比，生物材料固定化后，具有热稳定性提高、可以重复使用、反应完成后不需要进行生物材料和反应物质的分离、可避免外源微生物的污染和降解等优点。生物材料常用的固定化方法包括：夹心法（sandwich）、吸附法（adsorption）、包埋法（entrapment）、交联法（cross linking）、共价结合法（covalent binding）和微胶囊法（microencapsulation）等，它们固定生物材料的原理见图7-9。

1. 夹心法 本法将生物材料密封在双层微滤膜、超滤膜或透析膜之间。此法操作简便，不需任何化学处理，生物固定量大，响应时间短，重复性好。

2. 吸附法 这是在非水溶性的载体上，利用载体和生物材料物质之间的氢键、范德华力和离子键等吸附力使生物材料固定于载体上的方法。常用的载体有活性炭、高岭土、玻璃、硅胶、纤维素粉、胶原、离子交换树脂或琼脂糖衍生物等等。本方法具有操作简便、条件温和、对生物材料的活性结构破坏较少等优点。但是由于结合力弱，载体的物理或化学性质稍有改变就可能引起吸附解离，使生物材料脱落。

3. 包埋法 这是将生物材料固定在高分子聚合物微孔中的方法。常用的高分子聚合物包括，聚丙烯酰胺、聚氯酰胺、聚乙烯醇、光敏树脂、尼龙、醋酸纤维等化学合成物和海藻酸、明胶、胶原、琼脂等天然物。包埋法的优点是，对生物材料的活性影响小，聚合物的孔径大小可以任意

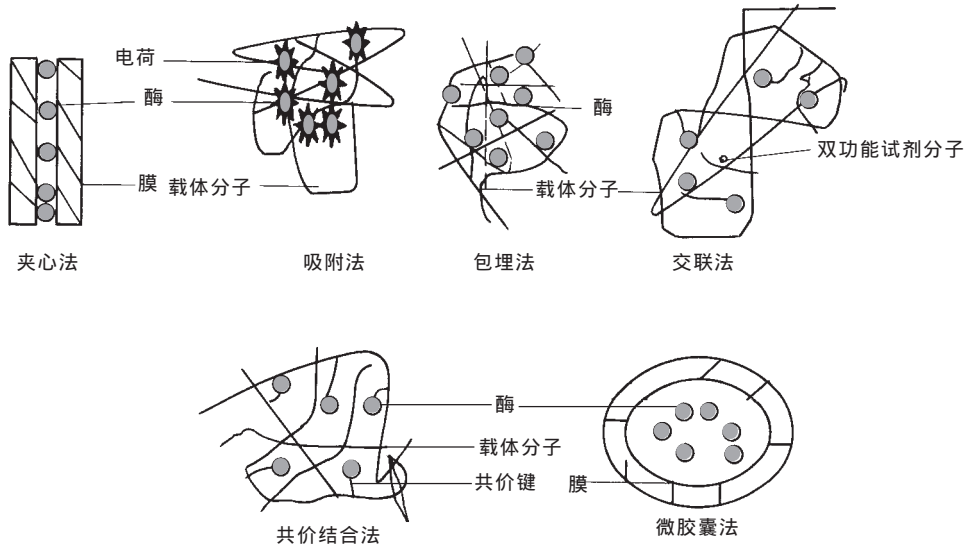


图 7-9 生物材料的固定化模式

调节等。

4. 交联法 这是采用双功能试剂，如戊二醛等，将生物材料结合到惰性载体上的方法。生物材料中参与偶联（结合）的基团包括—NH₂、—COOH、—SH、—OH、咪唑基和酚基等，但是这些基团不能在生物材料的活性中心及其附近，否则将严重影响生物材料的活性。交联法具有操作简便、结合牢固、可长时间使用等优点。但是在固定过程中对 pH 和温度等操作条件的控制要求非常严格，否则容易引起生物材料的部分变性。

5. 共价结合法 这是生物材料分子通过共价键和水不溶性载体结合的方法。在共价结合过程中，通常首先将活泼的重氮基团、亚氨基和卤素基团等引入到载体上使载体活化，然后这些基团再和生物材料分子中的氨基、巯基和羟基等结合，使生物材料固定在载体上。共价结合具有结合牢固、不易脱落、可长时间使用等优点。但是，载体的活化的操作复杂，反应条件比较激烈，因此需要严格控制操作条件以尽可能地减少生物材料活性的丧失。

6. 微胶囊法 这是将生物材料封闭于由膜组成的胶囊中的方法。微胶囊法条件温和，对生物材料的活性影响比较小，但是胶囊的稳定性一般较差。

以上是几种常见的生物材料的固定方法，各种方法都有其优缺点，因此在实际应用中通常将几种方法结合在一起使用，例如吸附法常和交联法结合在一起使用，这样既可以增加生物材料的结合的牢固程度，又可以减少生物材料活性的丧失。另外，各种固定方法都有其一定的使用范围，例如，夹心法比较适合于微生物细胞和动植物组织等生物材料的固定，而交联法和共价结合法则更适合于酶和抗原抗体等生物材料的固定化。

（二）成膜技术

如前所述，在生物传感器中，生物材料是以膜的形式和转换器结合在一起的。生物材料可以直接结合在换能器上形成生物膜，也可以和其他高分子材料固定化成膜后再和换能器结合，前一

种成膜技术的操作复杂，对生物材料活性的影响也比较大，但是响应时间短，灵敏度高，使用寿命较长；后一种成膜技术比较简便，但是响应时间较长，使用寿命也比较短。由于篇幅的限制，在这里仅仅介绍两种比较特别的成膜技术。

1. 半导体生物传感器中的成膜技术 半导体生物传感器是由半导体（基础）传感器和生物敏感材料组成的。半导体生物传感器通常是通过差分测量来对物质浓度进行分析的，半导体生物传感器中有一对（基础）传感器，其中一个作为参比，提供参比信号，另一个提供检测信号。在参比传感器上的生物材料（通常为酶）必须经失活处理，为了达到这一目的，常常采用如下方法。

(1) 紫外线照射法（ultraviolet irradiation）。在一个芯片的两个极上均匀涂上（覆盖）一层活性固定化酶膜，在其中的一极上盖上光防护罩，然后以紫外线照射，由于紫外线的穿透能力很差，因此有光防护罩一极的酶保留活性，而另一极上的酶在紫外线的照射下失活，酶失活的一极就可作为半导体传感器中的参比。具体的过程见图 7-10。

(2) 光平板印刷法（optical plate imprinting）。在一块芯片上，首先将酶和光敏聚合物（如聚乙烯醇、聚丙烯酰胺等）的混合溶液涂布于芯片的两极，形成一层溶液膜，以光防护物盖住芯片，在需要有酶膜一极的部位开一个孔，然后以光照射，一定时间后，开孔一极上的光敏聚合物和酶的混合物溶液膜在光的照射下聚合形成固定化酶膜，另一极则仍然为溶液状态。将芯片置于溶剂中以超声波处理，去除未聚合的聚合物溶液和酶，而光聚合后的固定化酶膜仍保留在一极上，这就叫光平板印刷法。图 7-11 是光平板印刷法的示意图。

(3) 喷射法（inject nozzle）。在计算机的控制下，芯片在特定喷嘴和戊二醛蒸汽室间来回运动，当芯片上需要成膜的部位到达喷嘴处时，喷嘴将酶和其他高分子材料（例如牛血清白蛋白）的混合溶液滴注在该部位，然后进入戊二醛蒸汽室进行适度的交联成膜。如此重复数次，最后将整个芯片浸入戊二醛溶液中，进一步交联。

2. L-B 膜技术 L-B 膜技术是一种能在低温低压条件下制备高密度、分子排列方向一致的单分子层或多分子层薄膜的技术。以这种技术制成的膜以该技术的发明者 Langmuir 和 Blodgett 的名字命名，称为 L-B 膜。L-B 膜技术的基本原理是，生物大分子，例如脂质分子和某些蛋白质分子，在特定的条件下，在洁净的水表面展开后能形成水不溶性的液态单分子膜，小心压缩表面使液态膜逐渐过渡成为一分子厚度的拟固态膜。具体的过程见图 7-12。

生物大分子于水面上形成单分子液态膜（图 7-12a），基片（例如，电极）在单分子膜和界面

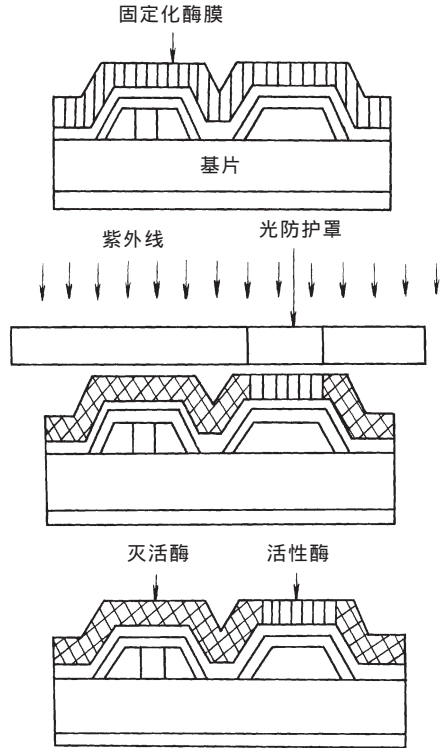


图 7-10 紫外线照射法的酶局部失活

间作起落运动，当基片第一次插入并抽出时，在基片的表面形成一层单分子膜（图 7-12b），如果基片继续做第二次起落（图 7-12c），则可以在基片上形成三层单分子膜（图 7-12d），依次类推。

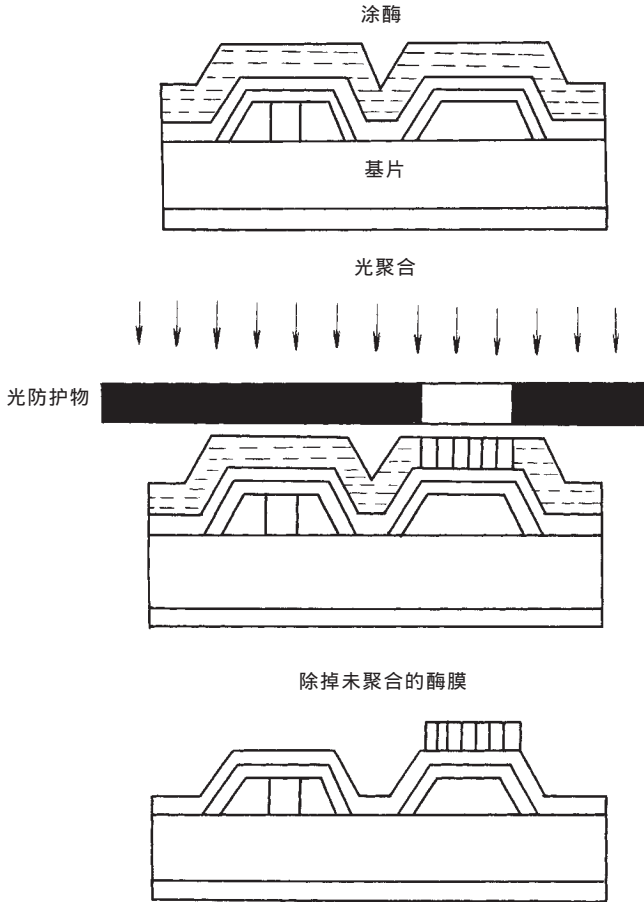


图 7-11 光平板印刷法示意图
(引自马立人、蒋中华、王升启)

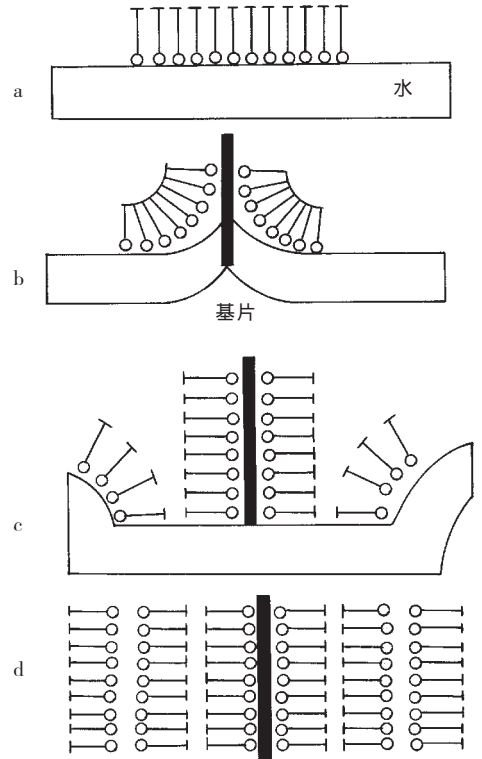


图 7-12 L-B 膜典型的成膜过程
a. 表面的单分子膜 b. 第一次抽出基片
c. 第二次插入基片 d. 第二次抽出基片
(引自马立人、蒋中华、王升启)

L-B 膜制成后，再将酶或抗体分子固定在膜上（中）就得到了单层或多层的酶或抗体 L-B 膜。

和一般的成膜技术制备的膜相比，以 L-B 膜技术制备的 L-B 膜至少具有以下优点：①L-B 膜可以很薄（数纳米以下），因此便于传感器的微型化而且响应时间短；②L-B 膜的构造和生物体内的膜构造很相似，有较好的仿生价值，便于制备可以在体内使用的生物传感器。

四、生物传感器在食品安全和品质控制中的应用

如前所述，生物传感器已广泛地应用于医学、军事、环保、农业和食品等领域。在食品领域

中,生物传感器主要用于食品组成成分(例如氨基酸、蛋白质和多糖等)的分析、食品发酵过程的在线控制、食品中各种有毒有害残留(例如农药残留和抗生素残留等)物质的分析以及食品污染微生物和生物毒素的分析等等。在这里将主要介绍生物传感器在有毒有害残留物的检测、污染微生物和生物毒素检测、以及食品添加剂检测等方面的应用情况。

(一) 农药和抗生素残留的分析

随着科学技术的发展,不断有新农药和新抗生素应用于农牧业。它们给人类带来富足的同时,在食品和环境中的残留也给人类的健康带来了危害,因此世界各国政府都非常重视对其残留的分析和监测。目前分析这些残留的方法主要是色谱法(气相色谱和液相色谱等),但是色谱法存在着仪器设备昂贵,操作复杂、检测时间长、不易推广和普及等不足,因此迫切需要一种快速、简便、灵敏、特异、可在样品采集现场进行分析的方法来作为色谱分析法的补充。生物传感器检测法正是能满足上述要求的分析方法。

1. 农药残留的生物传感器检测 1996年余孝颖等采用离子敏场效应管为基础传感器(换能器),将乙酰胆碱酯酶通过戊二醛共价交联固定于场效应管上,制备得到了乙酰胆碱酯酶场效应管传感器,用于分析敌敌畏等有机磷农药的残留。其分析有机磷农药残留的机理是,乙酰胆碱酯酶能催化乙酰胆碱水解成胆碱和乙酸,当存在有机磷农药残留时,它们能够抑制乙酰胆碱酯酶的活性,从而使底物的分解减少,胆碱和乙酸的产生减少,其中乙酸的减少量可以通过离子场效应管来测定,且在一定条件下,乙酸的减少量和有机磷农药的量之间存在一定的比例关系,因此根据乙酸的减少量就可以计算出有机磷农药的残留。实验表明,该生物传感器能很好地检测食品和水中有有机磷农药的残留,对敌敌畏等有机磷农药的检测灵敏度为 10^{-7}mol/L ,线性范围为 $5 \times 10^{-7} \sim 8 \times 10^{-6}\text{mol/L}$,传感器抗干扰能力强,使用寿命达20d以上,对水样中敌敌畏等有机磷农药的检测结果和气相色谱的检测结果之间有很好的相关性。

类似的研究报道还很多,目前有机磷农药中的马拉松、甲基马拉松、乙基马拉松、速效磷、久效磷和百治磷等,以及氨基甲酯类农药中的滴灭威、西维因、灭虫多和残杀威等农药在食品中残留量的生物传感器检测都有相应的研究报道。

1995年,Christopher等人采用多克隆抗体技术,得到抗多氯化联苯(一种农药)的抗体,然后制备了免疫光纤生物传感器,用于测定食品、水和牛奶中该农药的残留量,灵敏度达到 10mg/L ,检测时间仅需几十秒到几分钟。

2. 抗生素残留的分析 青霉素和磺胺是兽药中常用的抗生素,其残留会污染动物性食品,从而对人类的健康造成危害。Sternesjoes等人采用免疫传感器测定了牛奶中磺胺二甲嘧啶的含量,灵敏度达到 1ng/g ,传感器表面经NaOH和HCl处理后可以重复使用。Avon等用抗体酶共轭物为敏感材料结合光度分析法检测了牛奶中青霉素的含量。

(二) 食品添加剂的分析

食品添加剂的种类很多,在食品中添加适量的添加剂对延长食品的保质期,提高和改善食品的品质都有很好的作用。但是过量的食品添加剂通常会对人体造成危害,因此对食品中添加剂含量进行分析和监测是非常必要的。常规的检测方法,一般存在操作复杂和检测时间长等缺陷,而生物传感器则可以弥补上述不足。

亚硫酸盐是常用的食品防腐剂和漂白剂,但是亚硫酸盐容易引起哮喘,因此美国FDA规定

了其在新鲜水果和蔬菜等食品中的含量不得超过 $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 。Groom 等人将亚硫酸氧化酶固定于玻璃电极上, 结合流动注射分析系统制成了测定亚硫酸盐的生物传感器, 其灵敏度(检出下限)达到 5 nmol/L , 线性范围为 $0 \sim 5 \text{ mmol/L}$, 电极在 3 mol/L 的硫酸盐溶液中 4°C 保存两个月活性不变。Kawamura 等采用 SO_2 自养细菌和氧电极构成测定 SO_2 的微生物传感器, 测定了醋、大豆蛋白和冻虾等食品中的 SO_2 的含量, 检测下限为 0.1 ng/g , 检测时间仅为 5 min 。

天冬酰苯丙氨酸甲酯, 又称甜味素, 是人工合成的低热量甜味剂。Guilbault 等将天冬氨酸酶固定于氨电极上, 制成生物传感器, 其检测线性范围为 $0.4 \sim 0.8 \text{ mmol/L}$ 。1994 年 Malc 等将酶电极和流动注射分析系统相结合, 测定了饮料、布丁和酱等食品中甜味素的含量, 其检测的线性范围是 $2 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 检出极限为 $2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 。

烟碱酸属于 B 族维生素, 可以作为肉类食品的发色剂, 但是人体摄入过量的烟碱酸会引起瘙痒和头痛等中毒症状, 因此在日本已禁止使用。采用酶电极传感器测定肉制品中的烟碱酸含量, 检测下限为 5 mg/kg , 3 min 就可完成一个样品的检测, 检测结果和 HPLC 的检测结果接近, 而检测时间仅为 HPLC 的 $1/10$ 。

其他食品添加剂, 如防腐剂苯甲酸钠、羟苯甲酸钠、过氧化氢, 抗氧化剂抗坏血酸、脱氢抗坏血酸、儿茶酚、儿茶酚胺, 发色剂亚硝酸, 酸味剂磷酸和乳酸等等都可以用相应的生物传感器来检测它们在食品中的含量。

(三) 污染微生物的检测

污染食品的微生物的种类很多, 主要包括细菌、真菌和病毒等, 其中以细菌最为常见。污染食品的微生物可以分为腐败菌和病原菌, 腐败菌主要是通过对食品成分的分解和破坏, 同时产生有毒有害物质从而对人体造成危害。腐败菌本身通常不是致病菌。而病原菌除了能破坏食品的组成成分外, 其菌体本身也能使人致病。食品中污染微生物的检测方法通常是平板计数法, 其操作繁琐, 检测时间长, 特别是对于病原菌的检测, 有时长达 $1 \sim 2$ 周才能出结果, 因此各种快速检测方法不断涌现, 生物传感器检测方法就是其中的一种。

1. 腐败菌的检测 酿酒酵母、乳酸菌和枯草芽孢杆菌等是常见的食品腐败菌。1979 年, Matssunage 等人开发出一种基于微生物在代谢过程中能产生电子, 电子直接在阳极上放电产生电流, 通过测定电流大小从而测定微生物浓度的传感器。用该传感器能很好地检测酿酒酵母和乳酸菌等微生物的数量。1993 年, Swensin 等研制了一种光纤生物传感器, 将其直接放入待测溶液中, 通过测定微生物代谢产生的 CO_2 来计算微生物的浓度。

2. 病原菌的检测 常见的污染食品的病原菌有沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、李斯特氏菌、产气荚膜梭菌和蜡样芽孢杆菌等。这些病原菌按常规的检测方法检测时间很长, 而采用生物传感器则能迅速地测定它们的数量。用来测定病原菌的生物传感器主要是光纤生物传感器、免疫生物传感器和 DNA 生物传感器。目前, 上述病原菌都可以用相应的生物传感器来测定。

(四) 生物毒素的检测

污染食品的生物毒素主要包括细菌毒素、真菌毒素、藻类毒素以及动植物毒素, 其中以细菌毒素和真菌毒素最为常见。检测毒素的方法很多, 包括色谱法(气相色谱、液相色谱、薄层层析等)和生物学方法等, 这些方法检测时间长, 对样品的前处理复杂繁琐, 因此以免疫学方法和生

物传感器检测方法为代表的各种快速方法备受欢迎,有关免疫学检测方法将在本章的第二节做详细的叙述,在这里主要概述生物传感器在检测食品中污染的细菌毒素和真菌毒素中的应用。

1. 细菌毒素的分析 细菌毒素是由细菌分泌产生于细胞外或存在于细胞内的致病性物质。细菌毒素有内毒素和外毒素之分,内毒素是革兰氏阴性细菌细胞壁的组成成分之一的脂多糖,热稳定,抗原性差,不能转化为类毒素,毒性比较弱,毫克水平才能引起动物死亡;外毒素是细菌(主要是革兰氏阳性菌,也有少数革兰氏阴性菌)分泌于胞外的一种蛋白质,热稳定性差,抗原性强,能转化成类毒素,毒性很强,微克水平就能引起动物死亡。从现有的资料看,研究报道主要集中在运用免疫生物传感器分析检测肉毒毒素和葡萄球菌肠毒素等细菌外毒素。运用生物传感器能灵敏、准确、快速地检测到它们在火腿和奶油等食品中的含量。

2. 真菌毒素的分析 真菌毒素是真菌分泌产生的有毒次生代谢产物。常见的污染食品的真菌毒素主要有黄曲霉毒素、赭霉素、杂色曲霉素、T-2 毒素、腐马素、镰刀菌烯醇类毒素、展青霉素和橘霉素等等。检测食品中污染真菌毒素的方法主要有薄层层析法和液相色谱法等,近二十多年来免疫学方法在真菌毒素的检测中得到了较好的应用(详细的内容将在本章的第二节中叙述),以此为基础的免疫生物传感器快速检测真菌毒素的方法也有研究报道和应用,其中以免疫传感器用于检测黄曲霉毒素 B_1 和腐马素 B_1 的研究报道最多。此外,也有运用微生物传感器和以纤毛虫为生物敏感材料的传感器检测展青霉素、黄曲霉毒素 B_1 和 T-2 毒素的研究报道。

3. 其他生物毒素的检测 生物传感器除了用于上述细菌毒素和真菌毒素的检测外,也有用于检测食品中污染的动植物毒素。1994 年 Ogert 等人建立了运用光纤免疫传感器快速检测蓖麻毒素的方法,首先将抗蓖麻毒素抗体结合于光纤的顶端形成光纤探头,测定时将探头插入样品反应室中反应 10min,然后以缓冲溶液冲洗探头,加抗蓖麻毒素荧光抗体于探头上,就可测定样品中蓖麻毒素的含量,最低检出极限达 $1\text{ng}/\mu\text{L}$,检测的线性范围为 $1\sim 250\text{ng}/\mu\text{L}$ 。另外,生物传感器也可用于检测海产品中沙蚕毒素的含量。

(五) 食品新鲜度的分析

新鲜度是评价食品品质的重要指标之一,通常是通过人的感官来检验的,但是感官检验的主观性强,个体差异大,因此人们一直在寻找客观的理化指标来替代之。生物传感器在分析检测食品新鲜度方面也显示了巨大的应用潜力,目前已有检测鱼、肉和牛乳的生物传感器问世。

1. 鱼鲜度传感器 鱼死亡以后,鱼肉会发生一系列变化,根据这些变化可以判断出鱼的新鲜程度。从感官上讲,根据鱼死后体表、鳃、眼和肌肉等的状态,可以判断鱼的鲜度,但是非常难以量化。从物理指标看,根据鱼肉的硬度、鱼肉的电阻率、鱼肉渗出物的黏度、鱼眼睛反射指数等指标都应可以判断鱼的鲜度,不过这些指标在实践中还没有得到应用。从化学变化看,鱼死亡后,鱼肉中的胺类物质、挥发性酸、pH 和 ATP 等都会发生变化,根据这些变化同样可以判断出鱼的新鲜程度,但是分析测试的操作复杂,而且不同品种的鱼上述各种物质的变化情况不一样。微生物指标,鱼死亡后,鱼体表和鱼肉中的微生物随着时间的延长数量迅速增加,通过培养分析微生物的变化,也可以评价鱼的鲜度,但是目前各种微生物检测方法所需的时间过长,因此没有实用价值。根据鱼死亡后,鱼肉中 ATP 分解代谢后各种代谢产物之间的比例关系,即所谓的 K 值或 K_1 值也能很好地评判鱼的新鲜度,目前日本等国已制订了根据 K 值或 K_1 值判断鱼新鲜度的标准,也成功研制了测定 K 值或 K_1 值的各种生物传感器。以下将主要介绍这种生物传感器

在鱼鲜度评价中的应用。

在介绍测定 K 值或 K_1 值的各种生物传感器之前，首先讲一讲 K 值和 K_1 值是怎样定义的。鱼死亡后，鱼肉中 ATP 是按以下过程分解代谢的：ATP（三磷酸腺苷）在 ATP 酶的作用下分解成 ADP（二磷酸腺苷），ADP 在磷酸激酶的作用下分解产生 AMP（一磷酸腺苷），AMP 在 AMP 脱氨酶的作用下转化为 IMP（肌苷酸），IMP 在 5'-核苷酸酶的作用下分解成 HxR（肌苷），HxR 在核苷磷酸化酶的作用下分解成 Hx（次黄嘌呤），Hx 在黄嘌呤氧化酶的作用下分解成尿酸。简单地讲，鱼死亡后，鱼肉中的 ATP 进行以下的代谢：ATP→ADP→AMP→IMP→HxR→Hx→尿酸。所谓的 K 值是指上述 ATP 代谢产物中，肌苷和次黄嘌呤占 ATP 代谢产物总量的百分数，即， $K(\%) = [(HxR + Hx) / (ATP + ADP + AMP + IMP + HxR + Hx)] \times 100$ 。由于鱼死亡后 ATP、ADP 和 AMP 的代谢非常快，一般在很短的时间（24h）内，它们在鱼肉中的含量就几乎为零，而一般在市场上出售的鱼都是死亡 24h 以后的鱼，因此 K 值可简化为 K_1 值，即， $K_1(\%) = [(HxR + Hx) / (IMP + HxR + Hx)] \times 100$ 。按照日本的标准， $K_1 < 0.2$ 时，鱼的品质极好， $K_1 = 0.2 \sim 0.4$ 时，鱼品质较好。目前测定 K_1 值的生物传感器主要有如下几种。

(1) 多电极传感器系统。该系统主要由四根氧电极组成，其中一根作为参照，另外三根电极的表面分别固定有以下酶膜：黄嘌呤氧化酶膜，核苷磷酸化酶与黄嘌呤氧化酶膜，5'-核苷酸酶、核苷磷酸化酶与黄嘌呤氧化酶膜，测定时将四根电极同时放入样品液中，上述三根酶电极产生的电信号分别反应了样品液中 Hx 的浓度，(HxR + Hx) 的浓度和 (IMP + HxR + Hx) 的浓度，通过计算机处理很容易计算出 K_1 的大小。运用该传感器，只需 20~50 μ L 样品液，8min 就可以测定 K_1 值。

(2) 多酶电极传感器系统。首先将 5'-核苷酸酶、核苷磷酸化酶与黄嘌呤氧化酶固定在一氧电极上，形成多酶电极。测试时，样品液先经过一离子交换柱，使 IMP、HxR 和 Hx 分开，然后分别流经有多酶电极的测试室，根据样品中不同组分流经测试室时电信号的响应情况，运用计算机分析计算出 K_1 值。

除了测定 K_1 值，也有通过生物传感器测定鱼肉中胺类物质的变化来反应鱼新鲜度的研究报道。另外，采用微生物传感器测定鱼鲜度的研究也有报道。

2. 肉鲜度传感器 和鱼肉一样，其他肉类也可以通过生物传感器来测定其鲜度。Kurube 等人将单胺氧化酶固定于氧电极上组成了测定猪肉鲜度的酶传感器，该传感器的响应时间为 4min，检测的线性范围为 $5 \times 10^{-6} \sim 10 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 。Kress 等人研制开发出一种测定肉鲜度的匕首式生物传感器，测定时将传感器的探头插入肉表面 2~4cm 深度，通过测定葡萄糖的浓度来评价肉的鲜度。

3. 牛乳鲜度传感器 牛乳鲜度传感器主要通过测定牛乳中的微生物数量，牛乳的乳酸增加量，或牛乳中的脂肪分解成的短脂肪酸的量等来评价牛乳的鲜度。

第二节 免疫学技术与食品安全检测

很早以前免疫技术就被微生物学家和病理学家直接或间接用来检测微生物的病原性。最近二三十年来，随着各种快速、灵敏、特异的免疫学技术的出现，免疫学技术越来越广泛地应用于食

品安全检验和分析领域。

一、抗原与抗体

(一) 抗原

1. 抗原的定义 抗原 (antigen) 是指进入动物体内能刺激动物的免疫系统发生免疫应答, 从而引起动物产生抗体或形成致敏淋巴细胞, 并能和抗体或致敏淋巴细胞发生特异性反应的物质。由定义可知, 抗原包括两项基本属性, 一是免疫原性 (immunogenicity), 指抗原进入体内刺激免疫系统产生抗体或形成致敏淋巴细胞的特性; 二是免疫反应性 (immunoreactivity), 指抗原能和对应的抗体或致敏淋巴细胞发生特异性反应的特性。有些抗原不能刺激动物产生抗体, 只能和对应的抗体进行特异性结合, 即只有免疫反应性, 无免疫原性, 这类抗原被称为半抗原 (hapten)。相应地上述既具有免疫原性又具有免疫反应性的抗原被称为完全抗原 (complete antigen)。

免疫源性是完全抗原非常重要的性质之一, 影响抗原免疫原性的因素来自三个方面, 一是抗原本身的结构和性质, 一般地分子量越大, 分子结构越复杂, 与免疫动物的亲缘关系越远, 则其免疫原性越强; 二是免疫动物的遗传因素也影响着抗原的免疫源性, 例如免疫动物的主要组织相容性复合物 (major histocompatibility complex) 的 Ir 等基因在免疫应答中起着重要的作用; 三是免疫动物的机体与抗原的相互作用关系, 例如免疫途径、免疫所用抗原的剂量等都对抗原的免疫原性有影响。有些物质, 例如某些细菌毒素, 具有非常强的免疫刺激能力, 通常可达到一般抗原刺激能力的2 000倍, 因此只需极低的浓度就可以诱发极大的免疫反应, 这种物质被称为超级抗原 (superantigen)。超级抗原的概念是 1989 年 Kappler 和 Marrack 首先提出的, 它之所以具有非常强的免疫刺激能力主要是其刺激肌体产生免疫应答的机理和普通抗原的不同, 一般抗原需和由两条肽链 (α 链和 β 链) 组成的 T 细胞受体的抗原结合部位结合后才能激活 T 细胞, 而超级抗原只需识别 T 细胞抗原受体的 β 肽链就可以激活 T 细胞。

2. 抗原决定簇 抗原决定簇 (antigenic determinant) 或称为抗原表位 (antigenic epitope) 是位于抗原物质分子表面或者其他部位的具有一定组成和结构的特殊化学基团, 它能与免疫系统中淋巴细胞上的受体及相应的抗体分子结合, 它是免疫原引起机体特异性免疫应答和免疫原与抗体特异性反应的基本构成单位。在蛋白质抗原中, 3~8 个氨基酸残基可以构成一个抗原决定簇, 在多糖抗原中 3~6 个呋喃环可以组成一个抗原决定簇。以蛋白质抗原为例, 从结构上讲抗原决定簇可以分成两类, 一类是顺序决定簇 (sequential determinant), 又称为连续决定簇 (continuous determinant), 氨基酸的排列顺序决定着这类决定簇的功能基团; 另一类是构象决定簇 (conformational determinant), 它是依赖于蛋白质天然空间构象的决定簇, 这类决定簇通常由不连续的氨基酸顺序片段经肽链的折叠卷曲而成, 一般位于蛋白质的表面, 由于决定簇的氨基酸顺序是不连续的, 因此又称为不连续决定簇 (discontinuous determinant)。研究抗原的决定簇不仅可以揭示抗原与抗体结合的本质, 有助于更好地了解免疫学中的核心问题——免疫识别和应答的机制, 而且可以人工合成某些抗原决定簇, 这对于研制疫苗和特异性诊断试剂, 以及药物合成和抗病毒感染等方面都有很大的益处。

3. 抗原的分类 抗原的分类方法很多, 可以根据来源来分, 也可以根据其理化性质等来分。

根据来源分, 抗原可分为天然抗原、人工抗原和合成抗原等三类。天然抗原指的是天然生物、细胞及天然产物, 主要来自动物、植物和微生物, 例如血细胞、细菌和病毒、蛋白质、多糖、脂类和核酸等都可以是天然抗原。人工抗原是指人工化学改造后的抗原, 例如半抗原经化学改造后就是人工抗原。合成抗原是指化学合成的具有抗原性质的分子, 主要是氨基酸的聚合物。

根据抗原的水溶性, 抗原可分为不溶于水的颗粒抗原和可溶性胶体抗原两类。例如, 细菌的鞭毛、纤毛和完整的微生物菌体等都是颗粒抗原; 而蛋白质、多糖、DNA 和真菌毒素等都是可溶性胶体抗原。一般颗粒抗原的免疫原性大于可溶性胶体抗原的免疫原性, 在可溶性胶体抗原中以蛋白质的免疫原性最强, 其次是多糖和 DNA, 真菌毒素等小分子物质属于半抗原, 没有免疫原性, 必须和大分子物质 (通常是蛋白质) 结合后才具有刺激动物产生抗体的性质。

4. 抗原的制备

(1) 抗原的准备。对微生物细胞等颗粒状抗原, 只需对微生物进行扩大培养, 然后收集菌体即可。对蛋白质、多糖、DNA 和脂类等可溶性胶体抗原, 首先应根据其在生物细胞中的部位进行处理。对于存在于细胞内的物质首先应破细胞壁, 使它们释放出来, 然后收集含有这些物质的溶液, 再采用各种分离、提取和纯化方法进行分离和提取。对于分泌于细胞外的这些高分子物质则只需收集胞外液, 然后再进行分离纯化即可。有关这些高分子物质分离纯化方法, 本书的其他章节有叙述, 在此不再重复。

(2) 半抗原的改造。半抗原由于不能刺激动物产生抗体, 因此要研究半抗原的免疫学特性, 通常首先应将半抗原改造成既具有免疫原性又具有免疫反应性的完全抗原。将半抗原改造成完全抗原通常是将牛血清白蛋白 (BSA)、卵清白蛋白 (OV) 或人工合成的多聚氨基酸等连接在半抗原分子上, 增加其分子量, 从而使其转化成完全抗原。将半抗原转化成完全抗原的方法很多, 不同的半抗原可以采用不同的方法。在这里以真菌毒素中的黄曲霉毒素 B_1 (aflatoxin B_1 , AFB_1) 为例, 就半抗原的改造过程叙述如下。

黄曲霉毒素主要是由寄生曲霉 (*Aspergillus parasiticus*) 和产毒的黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 分泌的有毒次生代谢产物。它具有很强的急性毒性, 同时也是强致癌物, 它可以在农产品的产前、产后和加工运输等过程中污染食品和饲料, 进入人类食物链危害人类健康和安全。常见的黄曲霉毒素包括黄曲霉毒素 B_1 、黄曲霉毒素 B_2 、黄曲霉毒素 G_1 、黄曲霉毒素 G_2 、黄曲霉毒素 M_1 和黄曲霉毒素 M_2 , 其中以黄曲霉毒素 B_1 毒性最强。检测黄曲霉毒素 B_1 的方法有薄层层析法、高效液相色谱法和免疫学方法等, 其中免疫学方法是比较好的一种检测方法。以免疫学技术检测黄曲霉毒素 B_1 时首先必须使其和牛血清白蛋白 (BSA) 或卵清白蛋白 (OV) 等蛋白质相连, 转化成完全抗原。由于黄曲霉毒素 B_1 的性质稳定, 本身不含活性基团, 因此在其和 BSA 或 OV 连接之前, 通常首先将羧甲氧基胺 (H_2NO-CH_2-COOH) 引入其中, 使其转化为黄曲霉毒素 B_1 肟 (AFB_1O), 然后黄曲霉毒素 B_1 肟与载体蛋白 (BSA 或 OV) 连接成完全抗原。具体的过程见图 7-13。

将各种半抗原转化成完全抗原的具体操作方式和注意事项各不相同, 但是有一点是必须注意的, 即在操作过程中应尽可能保持半抗原结构的“完整性”, 不能过度破坏其结构, 以保持半抗原的“原始性”。

(二) 抗体

1. 抗体的定义、分布和分类 抗体 (antibody, Ab) 是由抗原刺激动物的免疫系统后, 由免疫系统分泌的能和相应抗原发生特异性结合的免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig)。通常 Ab 和 Ig 可作为同义词使用。抗体主要存在于动物血清中, 也存在于动物的其他体液和体外分泌液, 例如乳汁和细胞分泌液中。另外, 抗体还存在于某些细胞, 例如 B 淋巴细胞的膜上。Ig 包括很多种类, 根据 Ig 的理化特性和与抗原结合方式的不同, Ig 可以分为类和亚类, 例如人类的 Ig 可分为 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE 五大类, 其中 IgG 和 IgA 可进一步分为 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 和 IgA₁、IgA₂ 亚类。小鼠的 IgG 和人类的 IgG 相同, 但是 IgG 的亚类稍有差别, 分别为 IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃。IgG 是 Ig 中的主要的组成成分, 约占血清总蛋白质的 15%。应用于免疫学技术中的抗体主要是 IgG 和 IgM, 以 IgG 最为常用。

2. 抗体的结构 虽然 Ig 包括很多种类, 但是其基本的结构相同 (图 7-14), 一个抗体单体都由两条相同的轻链 (light chain) 和两条相同的重链 (heavy chain) 共四条链组成, 重链与重链之间和重链与轻链之间通过二硫键 (S—S) 连接。重链和轻链内含有一系列重复的同源单位, 每个单位长约 110 个氨基酸, 并于链内二硫键连成环状, 折叠形成球形结构, 称为 Ig 的功能区 (domain)。每条链上氨基酸种类及排列顺序变化较大的部分称为可变区 (variable region, V 区), 而氨基酸种类和顺序相对稳定的部分则称为恒定区 (constant region, C 区)。轻链有 κ 和 λ 两种型, 一个抗体单体中的两条轻链总是同型的。轻链的 V 区位于其氨基酸末端 (N-末端) 的 1/2 区域, 是轻链与抗原特异性结合的部位, 在 V 区中有三个区域的氨基酸种类和排列顺序变化最大, 这些区域被称为超变区 (hypervariable region)。重链的 V 区位于重链氨基末端 (N-末端) 1/4 或 1/5 的区域, 与轻链一样参与抗原的结合。和轻链一样, 重链的 V 区同样含有三个超变区, 重链和轻链的超变区形成立体空间结构, 其表面为抗原的结合部位, 由于这些超变区形成了与结合抗原结构互补的三维平面, 因此超变区又称为互补决定簇 (complementarity-determining regions, CDRs), 从 N-末端开始三个超变区, 即互补决定簇分别命名为 CDR₁、CDR₂ 和 CDR₃, 其中 CDR₃ 的氨基酸种类和

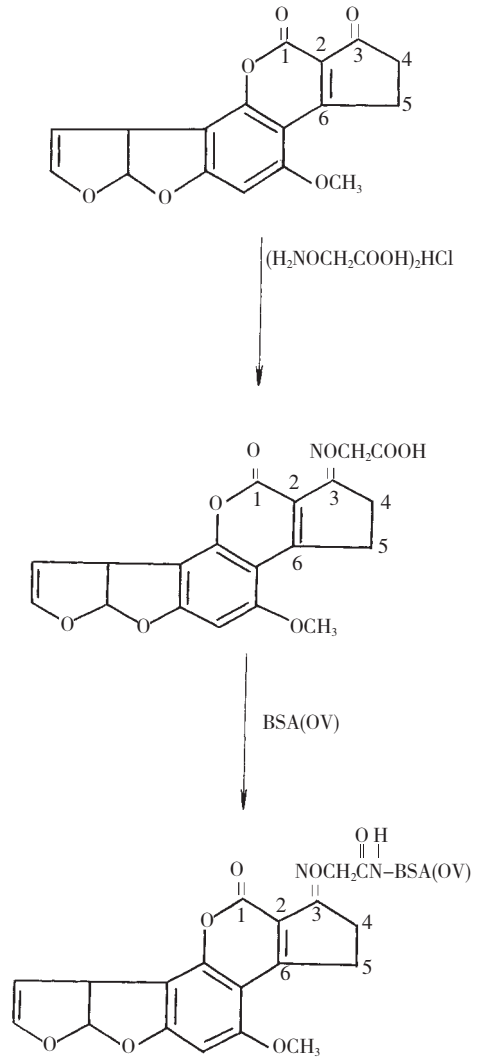


图 7-13 半抗原黄曲霉毒素 B₁ 转变成完全抗原示意图

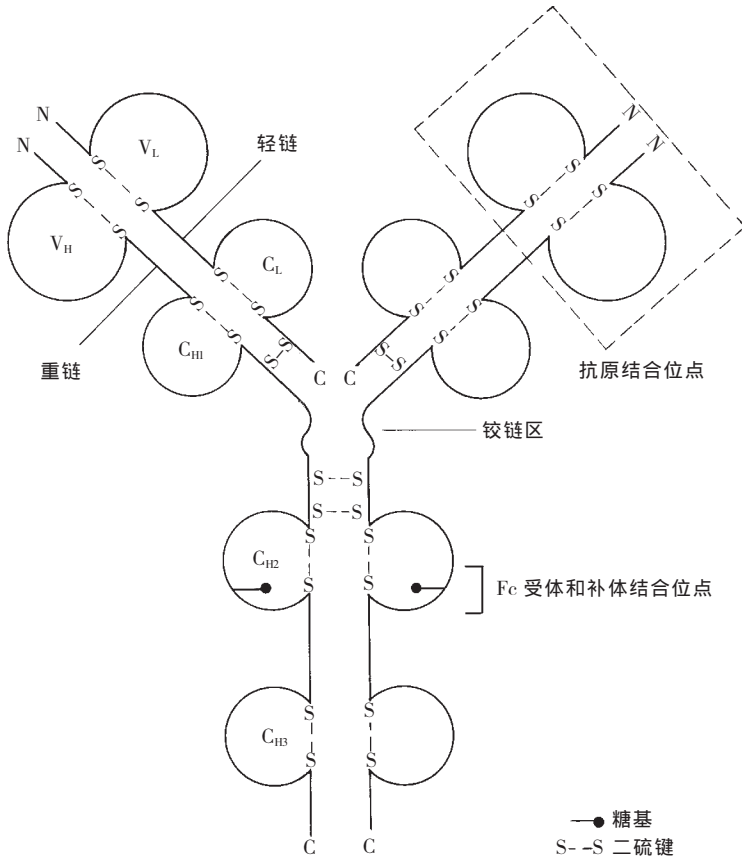


图 7-14 免疫球蛋白的分子结构示意图
(引自巴德年)

排列顺序变化最大。超变区约占 V 区的 20%~25%。其余部分相对保守，称为支架区 (framework region)。轻链的 C 区位于轻链羧基末端 (C-末端) 1/2 区域；重链的 C 区 (C_H) 位于其羧基末端 (C-末端) 3/4 区域，根据 C_H 的不同可以将人类抗体的重链分为 γ 、 δ 、 ϵ 、 α 和 μ 五类，上述人类的 Ig 分类正是根据 C_H 区的不同而划分的，IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE 对应的 C_H 区分别为 γ 、 μ 、 α 、 δ 和 ϵ 。另外，不同 IgC_H 区上的功能区的数量也不相同，IgG、IgA 和 IgD 的 C_H 区上有三个功能区，而 IgM 和 IgE 的 C_H 区上有四个功能区，在第一个功能区 (C_{H1}) 和第二个功能区 (C_{H2}) 之间富含胱氨酸和脯氨酸，可以自由折叠，该区域被称为铰链区 (hinge region)。当抗原与抗体结合时，该区域通过自由转动可以适合不同距离的抗原决定簇。另外，当抗原未与抗体结合时，抗体分子呈“Y”形，位于 C_{H2} 的补体结合点被覆盖，当抗原与抗体结合时，则呈“Y”形，补体结合点暴露，有利于补体的活化。

以上叙述的是抗体单体的结构，有些抗体 (Ig)，例如人的 IgG、IgE 和 IgD 都只有一个抗体单体构成，而 IgM 和 IgA 则通常由多个抗体单体组成。IgM 是由五个抗体单体，通过 J 链 (joining chain) 连接在一起的五聚体，而 IgA 则是由 J 链连接在一起的二聚体、三聚体甚至四聚体。

每个抗体单体有两个抗原的结合位点，如果将一个结合位点称为一价，那么 IgG、IgE 和 IgD 都是二价抗体，而 IgM 则是十价抗体。

3. IgG 的酶解片段 1959 年 Rodney Porter 及其同事以木瓜蛋白酶 (papain) 和胃蛋白酶 (pepsin) 对家兔的 IgG 分别进行了水解，得到了不同的水解产物。IgG 经木瓜蛋白酶水解后，裂解成三个片段，其中两个片段相同，每个片段都由一条完整的轻链和重链的 V_H-C_{H1} 组成，具有结合抗原的能力，被称为抗原结合片段 (antigen binding fragment, Fab)；另一个片段由重链的 $C_{H2}-C_{H3}$ 组成，具有自凝集并结晶的特点，因此称为可结晶片段 (crystallizable fragment, Fc)，Fc 能介导抗体的很多生物学功能。IgG 经胃蛋白酶水解后，可以得到一个大片段和多条小分子多肽，大片段称为 $F(ab')_2$ ，是 Fab' (含有铰链区的 Fab) 的双体，能于抗原结合；小片段的分子多肽称为 pFc' ，无生物学活性。IgG 的酶水解示意图见图 7-15。

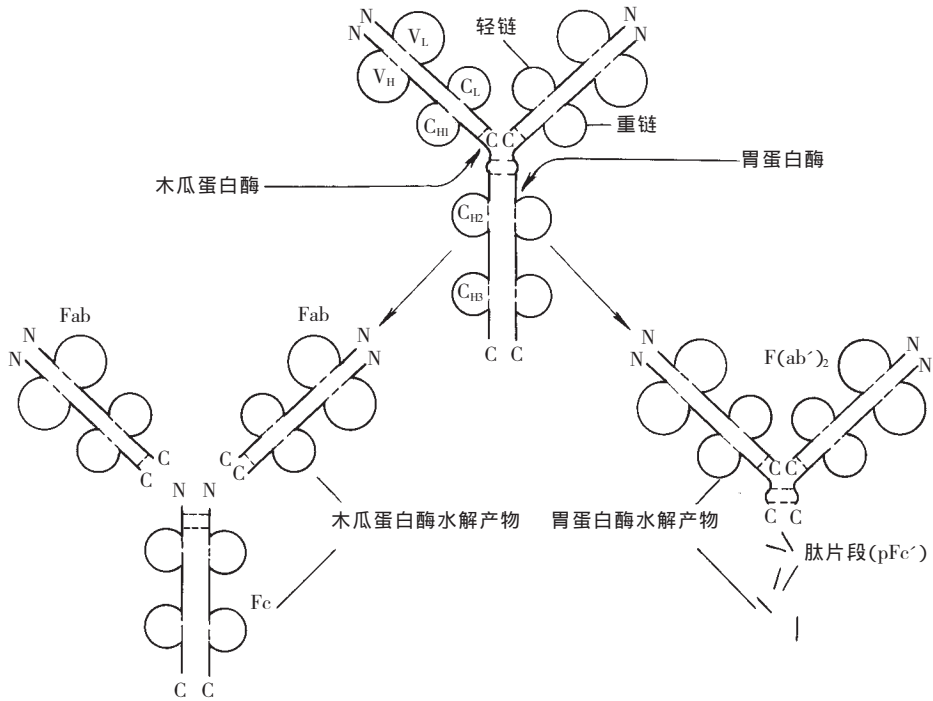


图 7-15 IgG 的蛋白酶水解片段 (引自巴德年)

4. 抗体的制备

(1) 多克隆抗体的制备。以抗原免疫实验动物可以获得含有特异性抗体的血清，即抗血清 (antisera)。由于抗血清中的抗体是由不同的抗原决定簇刺激不同的 B 细胞克隆产生的，因此这种抗体又称为多克隆抗体 (polyclonal antibody)。下面叙述制备多克隆抗体的几个环节。

① 实验动物的选择：用于制备多克隆抗体的实验动物包括哺乳类的鼠、兔、羊、马、驴、豚鼠、猪、猴、狗和禽类的鸡、鸭、鸽子，以及两栖类的蛙等，其中最为常用的是鼠、兔和羊等。在选择实验动物时首先应考虑抗原的来源和免疫动物的亲缘关系。一般来说，两者的亲缘关系越

远则产生的抗体效价越高，相反则抗体的效价越差。实验动物的年龄和营养状况与抗体的产生也有密切的关系，年龄太小易产生免疫耐受；而年龄过大或营养不良则动物的免疫能力低下，也不易产生高效价的抗体。选择好实验动物后，在注射抗原前应采集少量的动物血清（阴性血清）和抗原进行血清学反应，选择不和抗原反应的动物进行免疫实验。

②抗原的处理：抗原的处理除了前面叙述的抗原的分离提纯和半抗原的改造外，对于可溶性抗原，在注射免疫动物之前通常还需和免疫佐剂进行混合（颗粒抗原一般无需和佐剂混合，可以直接注射），以提高抗原的免疫原性等。佐剂（adjuvant）是具有增强机体的免疫应答能力，延长抗原在机体内的半衰期，降低抗原毒副作用，以使机体产生高效价抗血清的物质。最常用的佐剂是福氏佐剂（Freund adjuvant），它分为完全福氏佐剂（complete Freund adjuvant）和不完全福氏佐剂（incomplete Freund adjuvant）。不完全福氏佐剂是由1~6份的液体石蜡和1份羊毛脂充分混合而成；完全福氏佐剂是在不完全福氏佐剂的基础上，于使用前添加灭活的（2~20mg/mL）卡介苗混合而成。一般地，实验免疫动物首次注射抗原时，抗原通常和完全福氏佐剂混合，而在加强注射（首次注射抗原之后的注射）时则只需和不完全福氏佐剂混合即可。佐剂与抗原以1:1混合后，充分乳化至静置不发生油水分离时即可注射实验动物。

③动物的免疫：动物的免疫是一个非常复杂的过程，在免疫过程中，对抗原的免疫剂量、注射途径、加强免疫的时间间隔和加强免疫的次数等都需要认真综合考虑。

抗原的剂量应根据抗原的免疫原性强弱、动物的种类和大小以及抗原的注射途径等来决定。对于同一种抗原，在一定的剂量范围内，抗原的注射量与免疫反应的强度成正相关，抗原量过大或过小都易产生免疫耐受。免疫动物越大一次注射抗原的量也越多，小鼠一次注射的免疫乳液量为1~2mL，家兔的为2~4mL。

抗原的注射途径很多，不同的注射途径对抗原的吸收、机体的免疫应答、抗原的毒副作用和抗原的注射量等都有影响。抗原吸收越快，分解代谢越快，对机体的影响时间越短；单位时间内有效抗原的量越大，机体的免疫应答越强，抗原的毒副作用也越强。常用的抗原注射途径包括静脉、脾脏、淋巴结、腹腔、肌肉、皮下和皮内等，它们对抗原的吸收速度为，静脉=脾脏=淋巴结>腹腔>肌肉>皮下>皮内。在具体的免疫过程中应根据动物的种类、抗原的特性和是否使用佐剂等来选择注射途径，腹腔注射、肌肉注射、皮内注射、皮下注射和淋巴结注射适合于任何抗原，这些途径主要是通过刺激局部淋巴结发生免疫应答，初次免疫和加强免疫都可以使用。静脉注射只适合于可溶性抗原和分散的单细胞悬液，且不能使用佐剂，其诱发的免疫应答主要发生在脾脏。脾脏注射比较适合于微量抗原。

要得到高效价的抗体，除了应注意免疫途径和抗原的剂量外，初次免疫后再进行2~3次以上的加强免疫是非常必要的。两次免疫注射之间的时间间隔，小动物一般为10~14d，大动物则为2个月左右，在最后一次免疫加强注射后一周左右采集抗血清可望获得高水平的抗体。

④抗血清的采集、纯化和特性鉴定：加强免疫2~3次后，通过耳静脉或眼球（小鼠）采血，测定抗血清的效价，当抗血清达到理想的效价后，通过心脏采血或动脉放血采血，分离抗血清。获得的抗血清在通常情况下可以直接用于免疫学分析，但是在有些情况下，例如制备酶标抗体或二抗时，需对抗血清进行分离纯化，获得单一的抗体成分，以去除杂蛋白的干扰。抗体的分离纯化方法很多，包括中性盐沉淀法、凝胶柱层析、离子交换柱层析和亲和层析等，这些方法在本书

的酶工程中已有叙述，在此不再重复。

对收获后的抗血清或纯化后抗体的一些参数，例如效价、亲和力和交叉反应等进行分析是非常必要的。效价又称为滴度 (titer) 是表达抗血清中特异性抗体相对含量的一个指标，在一定条件下，抗血清经系列稀释后与定量的抗原反应，以能检测出抗血清存在的抗血清的最大稀释倍数为该抗血清的效价。不同的检测方法由于灵敏度的不同，测出的抗血清的效价也不一样，例如以双向免疫扩散法 (double immunodiffusion) 和酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 测得的效价就有很大的差异，后者远远大于前者。因此在叙述抗体的效价时一定要说明效价的测定方法。亲和力 (affinity) 是表示抗原抗体结合程度的指标，亲和力的大小可以用抗原抗体反应的平衡常数 K 来表示。

抗血清的交叉反应是衡量抗体特性的另一个重要的指标。理论上讲，抗体只能与产生该抗体的抗原发生反应，这是抗体特异性的表现，但实际上抗体还可以和其他抗原发生反应，即所谓的交叉反应。一方面是由于抗原的不纯造成的，另一方面不同抗原间相同或类似的抗原决定簇也是产生交叉反应的原因。应该说，完全没有交叉反应的抗体是不存在的，但是交叉反应太强的抗体也是没有应用价值的。

(2) 单克隆抗体的制备。

①单克隆抗体制备的原理：单克隆抗体 (monoclonal antibody) 与多克隆抗体 (抗血清) 的最大差别是单克隆抗体是由单一的 B 细胞克隆，针对单一的抗原决定簇产生的均一的免疫球蛋白。单克隆抗体不能用化学纯化方法从多克隆抗体中分离获得，它是通过杂交瘤技术，分离培养能产生抗体的单一的 B 淋巴细胞 (B 细胞克隆) 的方法获得的。1975 年 Kohler 和 Milstein 首次成功地将注射免疫了绵羊红细胞的小鼠脾脏细胞和小鼠的骨髓瘤细胞融合，通过分离筛选和克隆融合子等步骤，制备得到了小鼠抗绵羊红细胞的单克隆抗体。免疫致敏后的 B 淋巴细胞具有分泌特异性抗体的能力，但是在体外不能长期存活；而骨髓瘤细胞可以在体外长期存活但不能产生抗体；如将两种细胞杂交融合后，经分离筛选获得既能在体外长期存活又能针对单一抗原决定簇产生特异性抗体的融合子，就可以获得单克隆抗体，这就是单克隆抗体的制备原理。由于单克隆抗体是通过 B 淋巴细胞和骨髓瘤细胞杂交获得的，因此单克隆抗体制备技术又称为杂交瘤技术。

单克隆抗体制备技术自从其问世以来进展迅速，被免疫学、微生物学、肿瘤学、遗传学和分子生物学等各个研究领域应用，目前这一技术已日臻完善，并在小鼠-小鼠 B 淋巴细胞杂交瘤技术的基础上，又发展了人-人、人-小鼠以及大鼠-大鼠 B 淋巴细胞杂交瘤技术。此外，还建立了 T 淋巴细胞杂交瘤技术。这里仅就小鼠-小鼠 B 淋巴细胞的杂交瘤技术 (单克隆抗体制备技术) 进行简单的叙述。

②单克隆抗体的制备：单克隆抗体制备技术的流程见图 7-16。概括起来单克隆抗体制备技术包括以下几个步骤：A. 小鼠骨髓瘤细胞和 B 淋巴细胞的准备，小鼠骨髓瘤细胞有很多不同的株系，我国最为常用的是 SP2 0 和 NS-1。小鼠骨髓瘤细胞应当具备稳定、易培养、自身不分泌免疫球蛋白、融合率高等特点和必须是次黄嘌呤鸟嘌呤核苷酸转移酶 (HGPRT) 和 (或) 胸腺嘧啶激酶 (TK) 的缺陷型。使用前，小鼠骨髓瘤细胞应每天更换新鲜的培养液，使其达到对数分裂阶段，然后收集细胞备用。B 淋巴细胞是从免疫小鼠的脾脏中分离获得的，首先将抗原注射

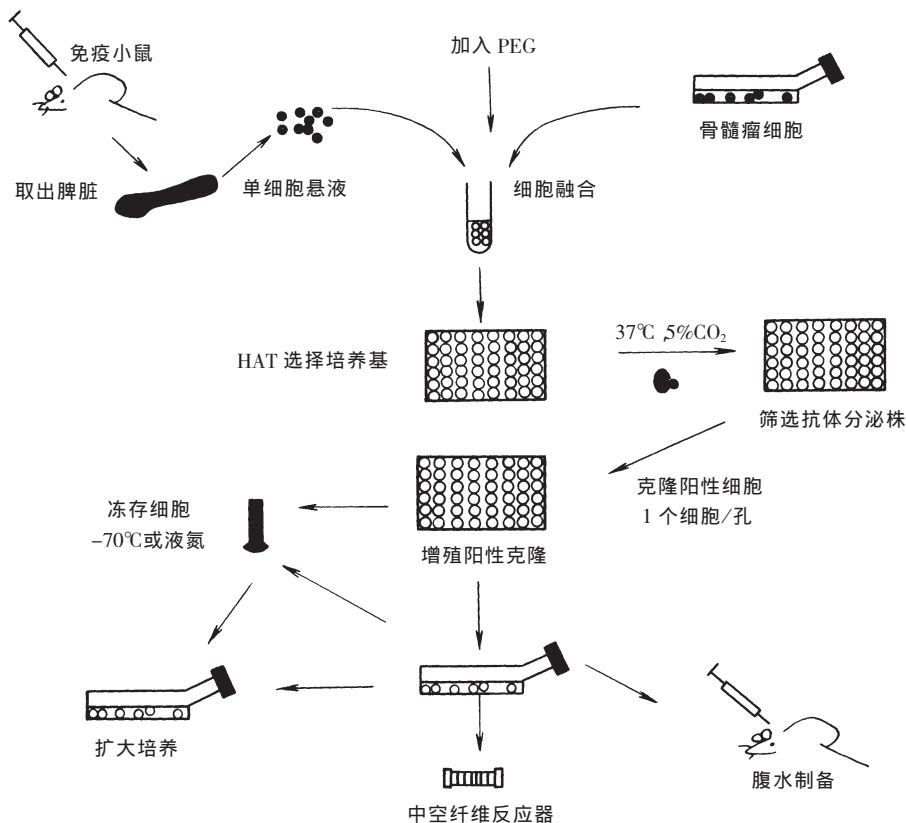


图 7-16 单克隆抗体制备流程

(引自于善谦等)

免疫小鼠，具体的方法和多克隆抗体制备过程中的免疫过程基本相同，不同的是为了得到具有旺盛抗体分泌能力的 B 淋巴细胞，一般应在摘脾脏前三天经静脉加强注射一次抗原。摘脾后将脾脏在无菌条件下破碎制备 B 淋巴细胞悬液备用。B. 细胞的融合和融合者的筛选，通常骨髓瘤细胞和 B 淋巴细胞是在聚乙二醇 (PEG) 的促进下进行融合的，也可以采用电融合的方式进行融合。融合后通过 HAT (H 是次黄嘌呤核苷，A 是氨基嘌呤，T 是胸腺嘧啶核苷) 选择性培养基筛选骨髓瘤细胞和 B 淋巴细胞的融合者。HAT 选择性培养基的选择原理是，骨髓瘤细胞是 HGPRT 和 (或) TK 的缺陷株，HGPRT 和 TK 是细胞合成 RNA 和 DNA 旁途径上的两种非常重要的酶，在核酸的正常合成途径被阻断的情况下，HGPRT 和 (或) TK 的缺陷的骨髓瘤细胞由于不能利用旁路合成核酸 (即使有 HGPRT 和 TK 的底物 H 和 T 存在也不能合成核酸) 而死亡。在 HAT 培养基中，A 是细胞核酸正常合成途径的阻断剂，H 和 T 分别是 HGPRT 和 TK 的底物，具有 HGPRT 和 TK 的细胞，当核酸的正常合成途径被阻断后，可以利用 H 和 T 依靠核酸的旁路合成途径合成核酸而继续生存。当骨髓瘤细胞和 B 淋巴细胞杂交时，在 HAT 培养基中，只有骨髓瘤细胞和 B 淋巴的融合子由于含有来自 B 淋巴细胞的 HGPRT 和 TK 才能在 HAT 培养基中长期存活，其他细胞都将死亡，这样融合子 (杂交瘤细胞) 得以筛选和繁殖。C. 阳性杂交瘤细

胞的检出和单克隆化,并非所有的杂交瘤细胞都能分泌针对目的抗原的特异性抗体,因此应该采用酶联免疫吸附法和放射免疫分析法等方法(关于这些方法的具体操作过程在本节的其他部分叙述),将能产生针对目的抗原产生特异性抗体的杂交瘤细胞,即所谓的阳性杂交瘤细胞检测出来。为了确保单克隆抗体的纯一性和避免其他阴性细胞对阳性杂交瘤细胞生长的影响,需要将阳性的杂交瘤细胞进行单细胞的分离和培养,即所谓单克隆化(clonization),常常需要经过反复多次的单克隆化才能得到单一纯正的单克隆子。获得的单克隆子应及时冻存以备后用,也可以扩大培养生产单克隆抗体。D. 单克隆抗体的扩大培养,生产大量单克隆抗体的方法目前常用的主要有三种:小鼠腹水制备、大瓶培养和中空纤维反应器培养,前者仅适合于实验室制备单克隆抗体,后两者适用于工厂化生产大量的单克隆抗体。小鼠腹水制备是将杂交瘤细胞接种定植于小鼠腹腔中,刺激小鼠分泌大量腹水,收集腹水,其中就含有较高浓度的特异性单克隆抗体。大瓶培养就是用1 000mL或更大的摇瓶培养单克隆子,收集上清液,分离纯化其中的抗体,但是上清液中抗体的浓度通常较低。中空纤维反应器是膜式反应器中的一种,有关该反应器的特征在本书的其他章节有叙述。运用这种反应器获得的反应液中抗体的浓度高,易于纯化,是比较经济的抗体生产方法。

③单克隆抗体的性质的鉴定:获得单克隆抗体后,和多克隆抗体一样,也需对其效价、亲和力和交叉反应(特异性)进行分析。另外,还需对免疫球蛋白的类和亚类以及结合位点等进行分析。

(3) 生物工程抗体。随着生物工程技术的发展,应用生物工程技术对抗体进行定向改造已成为可能,由此获得的抗体称为生物工程抗体(biological engineering antibody)。下面仅就运用生物工程技术对抗体进行改造的几个方面进行简单的叙述。

①抗体的化学修饰(antibody chemical modification):运用双功能交联剂将同位素、酶、毒素和药物等连接在抗体的 F_c 片段上,由于抗体和抗原的特异性结合发生在抗体的 F_{ab} 片段上,因此交联后并不影响抗体与抗原的结合,交联(标记)后的抗体可以作为诊断试剂,也可以作为药物的定向载体,引导药物或毒素到达抗原存在部位,使药物或毒素发挥更有效的作用,即所谓的“生物导弹”。这样可以大大减少药物和毒素等在肿瘤等治疗过程中的毒副作用,提高治疗效果。

②抗体基因文库(antibody recombination library):是将不同重链和轻链的基因随机组合,克隆到适合的表达载体中,在原核细胞中表达不同的抗体,从而形成一个抗体文库,运用抗原可以从中筛选到相应的抗体基因。运用抗体基因文库可以快速地获得单克隆抗体,另外,也可以获得一些不适合进行人工免疫物种的单克隆抗体,例如人源单克隆抗体。

③抗体基因的改造(antibody gene modification):将不同来源的抗体基因进行重组,可以获得所需要的抗体。例如,将鼠源抗体的V区基因与人源抗体的C区基因进行重组,获得的嵌合抗体(chimerical antibody)既有鼠抗体对抗原的高度亲和性,又减弱了鼠源抗体对人的免疫原性,从而可以提高抗体的治疗效果。

④催化性抗体或抗体酶(catalytic antibody, abozyme):1986年,Schultz和Lerner分别领导的研究小组同时证明了抗体和酶一样具有催化活性,他们将这种具有催化活性的抗体称为催化性抗体,又称为抗体酶。抗体酶和酶一样具有底物和立体专一性,在反应动力学和竞争抑制等方面也和酶相似。抗体酶的发现打破了只有酶才具有分子识别和加速催化反应的传统概念,为酶工程

学开创了新的领域。

二、常用的免疫学方法

(一) 免疫学方法的分类

免疫学方法 (immunoassay) 的种类很多, 分类方法也有很多种, 但是所有的免疫学方法都是以抗原抗体特异性结合为基础发展起来的。抗原抗体的特异性结合可以发生在生物体内也可以发生在体外, 用于食品卫生和安全检测的免疫学方法都是抗原抗体的体外反应, 在抗原抗体的体外反应中通常都需要使用含有特异性抗体的血清, 因此这些方法又称为血清学反应或血清学方法 (serological reaction, serological method)。

根据给出的检测结果是定性的还是定量的, 免疫学方法 (血清学方法) 可以分为定性免疫学方法 (qualitative immunoassay) 和定量免疫学方法 (quantitative immunoassay)。定性免疫学方法能给出分析样品中是否含有某种特定的抗原或抗体, 或者特定抗原或抗体的含量是否高于或低于某一数值; 而定量免疫学方法则能给出样品中特定的抗原或抗体的准确数量。

根据免疫分析过程中是否需要将结合在一起抗原抗体复合物和没有结合的游离的抗原抗体分离开来, 免疫学方法可以分为均相免疫学方法 (homogeneous immunoassay) 和非均相免疫学方法 (heterogeneous immunoassay)。均相免疫学方法无须将抗原抗体的复合物和游离的抗原抗体分开, 一般在较短的时间内就可以得到分析结果, 操作比较简便, 但是通常灵敏度较低, 一般仅适合于定性分析。非均相免疫学方法需要将抗原抗体复合物和游离的抗原抗体等物质分开, 反应时间较长, 操作比较复杂, 但是在去除游离抗原抗体的同时也去除了分析样品中的一些杂质, 减少了样品杂质对分析结果的干扰, 因此灵敏度和特异性都比较高, 适合于定量分析。

根据免疫反应过程中的现象和特征等, 免疫学方法又包括凝集反应 (agglutination) 和沉淀反应 (precipitation) 等。凝集反应是经典的血清学方法, 是颗粒抗原 (例如细菌、血红细胞等) 或可溶性抗原 (抗体) 结合于不溶性的载体微粒上后与相应的抗体 (抗原) 在适当的条件下, 经一定时间后凝集成肉眼可见的凝聚物。沉淀反应是将可溶性抗原 (例如蛋白质、多糖、类脂或它们的复合物) 与相应抗体在适量的电解质存在的条件下发生特异性结合, 形成抗原抗体复合物并出现肉眼可见的沉淀, 这种可见的沉淀只有在抗原抗体比例适合时才能形成, 在固体 (或半固体) 载体中这种沉淀表现为沉淀线, 在液体中则常表现为絮状沉淀。

标记免疫学技术 (labeled immunological technique) 是指抗原 (抗体) 被酶、同位素和荧光素等标记 (连接) 后与相应的抗体 (抗原) 反应, 通过测定酶催化反应的产物量、同位素的放射性强度或荧光素产生的荧光强度来计算抗原抗体的结合量, 进而计算出待检测物质 (抗原或抗体) 量的方法。

上述每一类方法又包括很多种的方法, 例如标记免疫学技术, 根据标记物的不同, 可以分为: 酶免疫分析 (enzyme immunoassay)、放射免疫分析 (radioimmunoassay) 和荧光免疫分析 (fluorescent immunoassay)。不同的分类方法之间存在交叉, 例如凝集反应和沉淀反应都属于均相免疫学方法, 且多为定性分析方法; 而非均相免疫学方法多属于定量免疫学方法。这里将仅仅介绍几种食品安全检测中常用的免疫学方法。

(二) 酶免疫分析方法

1. 概述 酶免疫分析 (enzyme immunoassay) 是 20 世纪 60 年代末 70 年代初诞生的, 1966 年 Nakane 和 Pierce 发表的题目为《酶标抗体: 制备和应用于抗原定位》的论文中正式提出了酶标抗体的概念。酶免疫分析技术的建立受到了荧光免疫分析和放射免疫分析的启发, 荧光免疫分析是 1941 年 Coons 建立的, 放射免疫分析是 1956 年 Yelow 和 Berson 建立的, 这两项免疫分析技术的建立大大地提高了免疫分析方法的灵敏度。但是荧光免疫分析存在着需要昂贵的荧光显微镜、染色标本不能长期保存和难以定量等缺点; 放射免疫分析存在着需要特殊的仪器、标志物因放射同位素的衰变而不稳定, 并且对人体有害等不足。上述这些不足促使人们寻找不需要特殊仪器设备, 对人体无危害, 而检测灵敏度与荧光免疫方法和放射免疫方法相同甚至更高的方法, 于是酶免疫技术于 20 世纪 60 年代末应运而生。

与荧光免疫方法和放射免疫方法相比, 酶免疫方法有很多优点, 表 7-2 列出了酶免疫方法与放射免疫方法优缺点的比较。目前, 前面两种方法正逐步被酶免疫方法所取代。上述三种方法最本质的区别是标记物的不同, 荧光免疫分析以荧光素为标记物, 放射免疫分析以同位素为标记物, 酶免疫分析以酶为标记物。由于标记物的不同, 具体的分析操作过程也有许多不同, 但是基本的原理是相同的, 都是以标记物 (荧光素、同位素或酶) 标记抗原或抗体, 之后和相应的抗体或抗原反应, 形成带有标记物的抗原抗体复合物, 测定复合物中标记物产生的各种信号, 即荧光的强度、放射性强度或酶催化底物产生的产物量, 在一定的范围内信号的强弱反映了抗原抗体复合物的量, 因此根据信号的强弱可以计算出和标记抗原抗体结合的待测物 (抗体或抗原) 的量。由于上述测定方法的基本原理相同, 因此酶免疫分析的有些分析过程借鉴了荧光免疫分析和放射免疫分析的方法。

表 7-2 酶免疫分析和放射免疫分析优缺点的比较

比较内容	酶免疫分析(EIA)	放射免疫分析(RIA)
灵敏度	EIA 的灵敏度比 RIA 的更高, 主要原因是 1. 酶是生物催化剂, 酶标物通过酶的催化作用可以将弱信号放大。因为, 通常情况下一个酶分子 1min 可以催化大约 10^6 个底物分子转化为产物, 产生检测信号 2. 用于 EIA 的酶的检测限值可以达到 $0.002 \times 10^{-18} \sim 1 \times 10^{-18} \text{mol}/100\text{min}$, 个别报道甚至可以检测出一个酶分子	1. 一个放射性标志原子仅给出一次蜕变信号便从反应体系中消失。另外, 在测定时通常仅有小部分的原子发生蜕变, 例如以常用的 ^{125}I 为例, 每分钟仅有 0.001% 的原子发生蜕变 2. ^{125}I 及其标志物最低检测限值为 $5 \times 10^{-18} \sim 10 \times 10^{-18} \text{mol}/100\text{min}$
对人体的危害	EIA 中酶标物对人体和环境均无危害, 使用不受限制	RIA 使用的放射性标志物对人和环境均可能造成危害, 因此使用将可能受到越来越严格的限制
检测仪器	简便, 可自动化也可以半自动化, 甚至凭肉眼也可以判读结果	检测仪器价格较贵, 难以自动化, 肉眼一般不能判读结果
试剂的稳定性	在合适的保存温度和介质中, 酶标试剂即使在稀释的溶液中也保存一年至数年之久	放射性标志物由于受到放射性元素半衰期的限制一般保质期较短
多样性	可以用于制备标志物的酶种类很多, 所酶标物的种类多。另外, 一种酶标物由底物的不同又可以产生多种检测信号	可用于制备标志物的放射性元素较少, 最常用仅有 ^{125}I

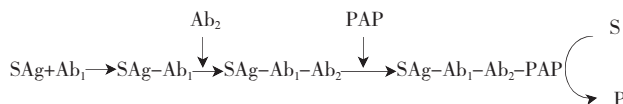
(续)

比较内容	酶免疫分析(EIA)	放射免疫分析(RIA)
反应体系要求	酶标物反应时对 pH、温度等要求较严格。另外,酶标物需要和底物反应一段时间后才能判读结果	放射性标志物对反应体系的要求不高,可以即时判读结果

注:本表参照尹伯元等主编的《标记免疫学》。

酶免疫方法诞生之初,主要用于对动物组织中抗原的定位,1971年荷兰学者 Van Weeman 和 Schurrs,瑞典学者 Engvall 和 Perlmann 分别提出了应用固相载体的酶联免疫吸附测定方法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA),使酶免疫方法的操作过程简便易行并可以定量,从而拓宽了其应用范围,也使酶免疫方法应用于食品安全和卫生检测成为可能。随后诞生的酶免疫方法包括将酶学与免疫扩散相结合的酶联免疫电扩散方法 (enzyme linked immuno-electro-diffusion assay),电镜技术和酶免疫方法结合的酶免疫电镜技术,以及围绕提高 ELISA 灵敏度而产生的荧光酶免疫方法、增强化学发光酶免疫方法和生物素-亲和素(链亲和素)酶免疫方法等等。

另外,在酶标记免疫方法建立和发展的同时,非标记的酶免疫方法(抗原抗体不以酶标记的酶免疫方法)也得到了发展。20世纪60年代末70年代初, Sternberger 等人运用过氧化物酶-抗过氧化物酶抗体(peroxidase-antiperoxidase)的复合物,通过二抗(Ab_2)的“桥联”作用将过氧化物酶(主要是 HRP)引入酶免疫分析中,建立了所谓的 PAP 法。PAP 过程以反应式表示如下图:



上图中 SAg 表示固定化的抗原或动植物组织中的抗原, Ab_1 表示抗体(一抗), Ab_2 表示二抗, PAP 表示过氧化物酶和抗过氧化物酶抗体的复合物, S 表示酶底物, P 表示产物。首先 Ab_1 和 SAg 结合形成复合物 SAg- Ab_1 , 然后 Ab_2 和 SAg- Ab_1 反应形成复合物 SAg- Ab_1 - Ab_2 , 之后和 Ab_1 来自同一种动物的抗过氧化物酶抗体(antiperoxidase, AP)与过氧化物酶的复合物(PAP)试剂再与 SAg- Ab_1 - Ab_2 结合形成更大的复合物 SAg- Ab_1 - Ab_2 -PAP, 最后加入底物反应,显色,从而确定抗原的位置或固定抗原的量。目前已有 PAP 试剂出售, PAP 主要是由三个 HRP 分子和两个抗 HRP 的抗体分子(AP)构成的十分稳定的环状复合物,通过 AP 可以结合多个 HRP 分子而起放大作用,所以 PAP 的灵敏度很高,它可以达到荧光免疫方法灵敏度的 100~1000 倍。

综上所述,酶免疫方法包括的内容很多,至少包括酶标记免疫方法、非标记酶免疫方法和酶免疫电镜方法。ELISA 仅仅是酶标记免疫方法中的一种,但是由于 ELISA 是目前应用得最为普遍的一种酶免疫方法,因此下面就 ELISA 的原理、分类和分析检测过程进行叙述。

2. 酶联免疫吸附方法(ELISA)

(1) 原理。以 96 孔、48 孔或 40 孔的聚丙烯塑料微孔板(microwell plate, 又称为酶标板)为载体,在适当的条件下使抗原或抗体上包被(吸附)在酶标板微孔的内壁上成为所谓的包被(固相)抗原或抗体,没有被吸附(游离)的抗原或抗体通过洗涤除去。然后直接加入酶标记抗

体或抗原（或先加入适当的抗体或抗原与包被抗原或抗体反应后，再加入相应的酶标记抗体或抗原）形成酶标记的抗原抗体复合物固定在微孔或试管，没有吸附的酶标记物洗涤去除，加入酶底物溶液（通常没有颜色）于微孔中，复合物上的酶催化底物使其水解、氧化或还原成为有色的产物。在一定的条件下，复合物上酶的量（也反应了固定化的抗原抗体复合物的量）和酶产物呈现的色泽成正比，因此可以用分光光度计进行测定，从而计算出参与反应的抗原和抗体的含量。这就是 ELISA 的原理。

(2) 分类。ELISA 可以分为直接法、间接法和夹心法等几种。直接法（direct ELISA）是指酶标抗原或抗体直接与包被在酶标板上的抗体或抗原结合形成酶标抗原抗体复合物，加入酶反应底物，测定产物的吸光值，计算出包被在酶标板上的抗体或抗原的量。其反应原理见图 7-17A。间接法（indirect ELISA）是将酶标记在二抗上，当抗体（一抗）和包被在酶标板的抗原结合形成复合后，再以酶标二抗和复合物结合，通过测定酶反应产物的颜色可以反映一抗和抗原的结合情况，进而计算出抗原或抗体的量（图 7-17B）。夹心法（sandwich ELISA）是先将未标记的抗体包被在酶标板上，用于捕获抗原，再用酶标的抗体与之反应形成抗体-抗原-酶标抗体复合物；也可以像间接法一样应用酶标二抗和抗体-抗原-抗体复合物结合形成抗体-抗原-抗体-酶标二抗复合物（图 7-17C），前者称为直接夹心法，后者称为间接夹心法。

上述三种方法又可以分为竞争法和非竞争法。图 7-17 所示均为非竞争反应方法，这些方法不存在抗原抗体的竞争反应。所谓竞争法就是在抗原抗体反应过程中有竞争现象的存在。以下以

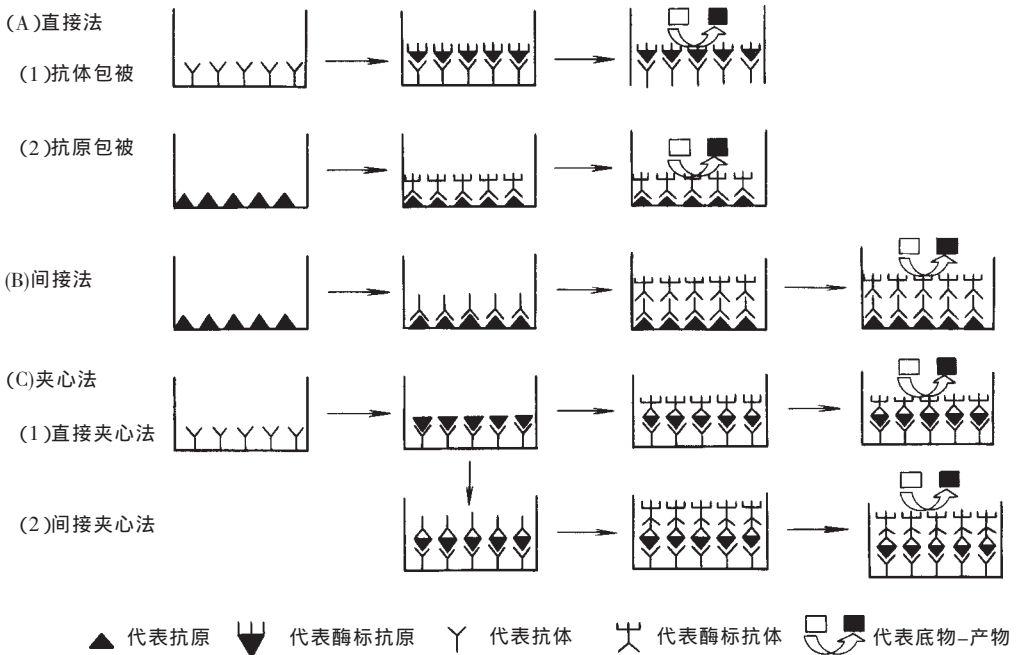


图 7-17 ELISA 原理图
(引自于善谦等)

直接法中的酶标抗原竞争法为例进行说明(图 7-18)。首先将包被了抗体的酶标板的微孔分为测定孔和对照孔,在测定孔中同时加入酶标抗原和非酶标抗原(通常来自于待测样品),标记抗原和非标记抗原相互竞争包被抗体的结合点,没有结合到包被抗体上的标记抗原和非标记抗原通过洗涤去除,非标记抗原浓度越高,则结合到包被抗体上的量就越多,而酶标记抗原结合在包被抗体上的量就减少;相反,非标记抗原浓度越低,则结合到包被抗体上的标记抗原的量就越多。对照孔中不加入非标记抗原,只加标记抗原。这样对照孔中结合的酶标记抗原的量最多,酶反应产物的颜色越深,而测定孔中颜色的深浅则反映了非标记抗原(待测物)的浓度,颜色越深非标记抗原的浓度越低,颜色越浅则浓度越高。同样夹心法和间接法也有相应的竞争法,其中以间接竞争法最为常用。

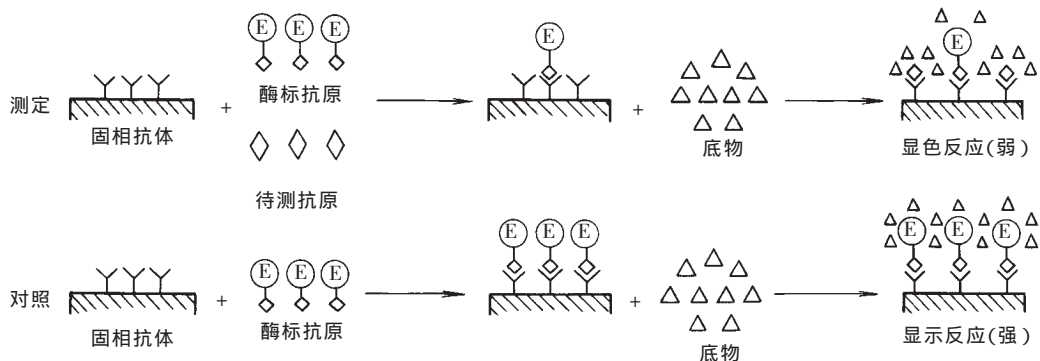


图 7-18 酶标抗原竞争 ELISA 示意图
(引自孙树汉)

(3) ELISA 的操作过程。

①试剂的准备:ELISA 中主要的试剂有抗原抗体、酶标抗原或抗体、酶和底物等。抗原抗体是所有的免疫学反应中都必须具备的,有关它们的制备在本节的前面已经讲过。酶标抗原或抗体是 ELISA 的核心试剂,这些试剂可以自己制备也有现成的试剂(例如酶标二抗),可以购买。在自己制备酶标物时,除了应准备好纯化的抗原和抗体外,还应准备好纯化的酶,酶可以自己从动植物组织或微生物中提取,但过程复杂,而且纯度和活性通常很难保证,因此最好从试剂公司购买。酶和抗原或抗体连接方法的基本原理和酶固定化方法的原理相同,常用的方法包括:以戊二醛为交联剂的戊二醛法和以过碘酸盐为氧化剂的过碘酸氧化法等。这些方法的具体操作过程请参阅本书和其他参考书的相关内容。ELISA 中常用的酶包括辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)、葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GO)、 β -D-半乳糖苷酶(β -D-galactosidase, BG)、脲酶(urease)等,其中 HRP 和 AP 应用最多。HRP 的底物很多,在 ELISA 中常用是邻苯二胺与双氧水和 5-氨基水杨酸与双氧水等。AP 常用的底物是对位硝基酚磷酸酯和酚酞单磷酸酯等。

②ELISA 的操作过程:ELISA 的种类很多,不同 ELISA 的具体操作过程不完全相同,但是基本的过程是一致的。下面以间接竞争 ELISA 测定黄曲霉毒素 B_1 (AFB₁) 为例,对 ELISA 的具体操作过程叙述如下。

A. 抗原的包被 (antigen coating), 将 AFB₁ 与牛血清蛋白 (BSA) 的连接物 AFB₁-BSA (也可以是卵清白蛋白的连接物 AFB₁-OV) 溶解于 0.1mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液中, 将溶液加入酶标板的微孔内, 通常每孔加 200 μ L, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜, 取出恢复至室温, 倾去微孔内溶液 (包被液), 以含有 0.05% 的 Tween-20 的 pH7.0 的 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲溶液生理盐水 (PBST) 满孔洗涤三次, 每次 5min, 扣干, 即得到包被有 AFB₁-BSA 的酶标板。在这个过程中 AFB₁-BSA 通过物理吸附包被 (黏附) 在酶标板微孔的内壁上, 没有包被的抗原洗涤去除。

包被抗原的浓度对最后的测定结果有较大的影响, 浓度过高或过低都会影响测定结果, 图 7-19 是不同包被浓度时, 竞争 ELISA 的抑制曲线。从图可以看出, 包被浓度对灵敏度的影响较大, 当包被浓度为 5 μ g/mL 时, 灵敏度 (最小检出量) 达 1.57ng/mL, 其他浓度的灵敏度都比该浓度的差, 这说明 5 μ g/mL 是较合适的包被浓度。

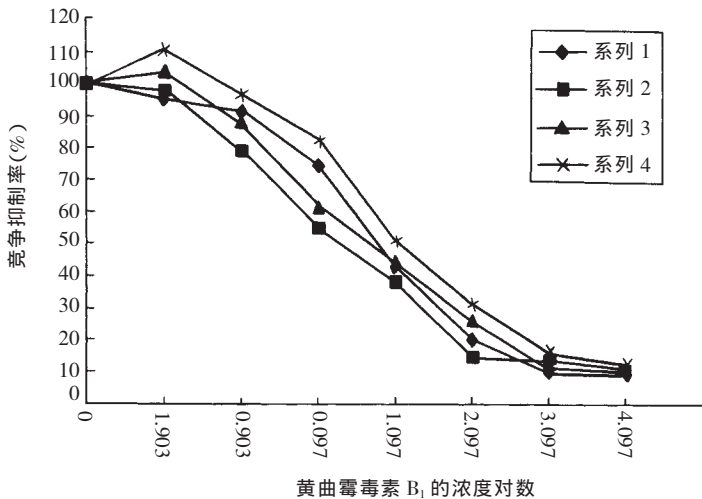


图 7-19 不同包被抗原浓度对 ELISA 竞争抑制曲线的影响*

系列 1. 包被浓度为 0.5 μ g/mL 系列 2. 包被浓度为 5 μ g/mL

系列 3. 10 μ g/mL 系列 4. 包被浓度为 20 μ g/mL

纵坐标的竞争抑制率是不同浓度的 AFB₁ 微孔的 OD_{490nm} 值与 AFB₁ 浓度为零的对照孔的 OD_{490nm} 值之比的百分数

从宏观上看, 包被浓度无论是过高还是过低都表现为灵敏度差, 但是从微观上分析, 它们的情况是不同的, 低包被浓度时, 包被抗原的量不足, 微孔内吸附的抗原量少, 可供抗体结合的抗原决定簇少, 从而影响灵敏度; 而高浓度时, 包被抗原的量过多, 微孔内吸附的抗原太多, 产生空间位阻, 阻碍抗体与抗原结合, 同样可供抗体结合的抗原决定簇少, 从而影响包被抗原进一步和抗体结合, 降低了灵敏度, 因此只有合适的包被抗原浓度, 才能得到最好的灵敏度。它们的这种关系图示如下图 7-20。

B. 封阻 (blocking), 所谓封阻是指酶标板被抗原包被后, 在微孔中加入一定浓度 BSA、OV、明胶或脱脂牛奶等溶液以封阻微孔内没有被抗原包被的空隙, 避免抗体的非特异性吸附于这些空隙, 以提高实验结果的准确性和可靠度的过程。常用的封阻剂包括 BSA、OV、明胶和脱脂牛奶等, 其中以脱脂牛奶较为便宜, 而且封阻效果和其他几种封阻剂没有明显的差别。

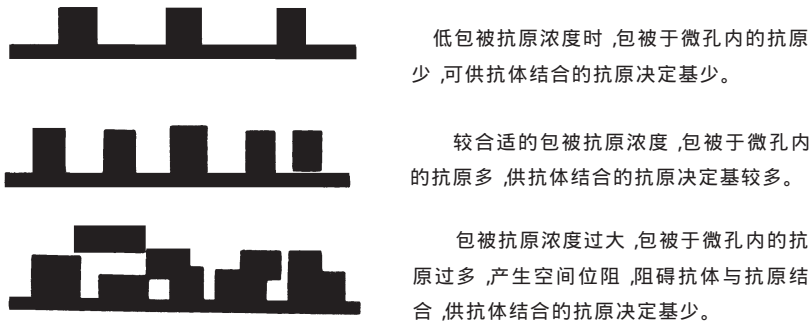


图 7-20 包被浓度对有效包被量影响的示意图

■代表包被抗原 ■代表微机板壁

图 7-21 是以不同浓度的脱脂奶粉为封阻剂时的 ELISA 的竞争抑制曲线。从图上可以看出,除 1% 的浓度外,其他三浓度的竞争抑制曲线基本一致,灵敏度也相同,因此在实验中可以用 3% 的脱脂奶粉作为封阻剂。

C. 抗原抗体竞争反应 (competitive reaction of antigen and antibody), 在酶标板的每个微孔中加入一定量 (例如 $90\mu\text{L}$) 的适当稀释度的抗体 (抗血清), 同时分别加入一定量 (例如 $10\mu\text{L}$) 的不同稀释倍数的 AFB₁ 标准溶液, 或待测样品的抽提液 (不同浓度的 AFB₁ 标准溶液用于作标准曲线), 混匀, 37°C 保温保湿 1~2h, 包被在酶标板上的固定抗原 (AFB₁-BSA) 和添加的 AFB₁ 或样品抽提液中的 AFB₁ 等游离抗原竞争抗体的结合位点, PBST 洗涤扣干三次, 游离的抗原抗体复合物被洗涤去除。

D. 酶标二抗与抗原抗体复合物的反应 (reaction of second antibody labeled enzyme and antigen-antibody complex), 将一定量 (例如 $100\mu\text{L}$) 适当稀释的酶标二抗溶液加入各反应孔, 37°C 保温保湿 1~2h, 酶标二抗和抗原抗体复合物反应, 形成抗原-抗体-酶标二抗的复合物固定在酶标板上, PBST 洗涤扣干五次, 将游离多余的酶标二抗去除。

E. 底物显色反应和吸光值的测定 (color reaction of substrate and OD detection), 每孔加反应底物 $100\mu\text{L}$ (40mg 邻苯二胺溶于 100mL pH5.0 的 0.2mol/L 柠檬酸-0.1mol/L 磷酸氢钠缓冲溶液, 加入 $150\mu\text{L}$ H_2O_2 , 现配现用), 37°C 保温保湿, 避光反应 30min, 每孔加 $50\mu\text{L}$ 2mol/L H_2SO_4 终止反应。5min 后, 以酶联免疫测定仪于 490nm 测吸光值。

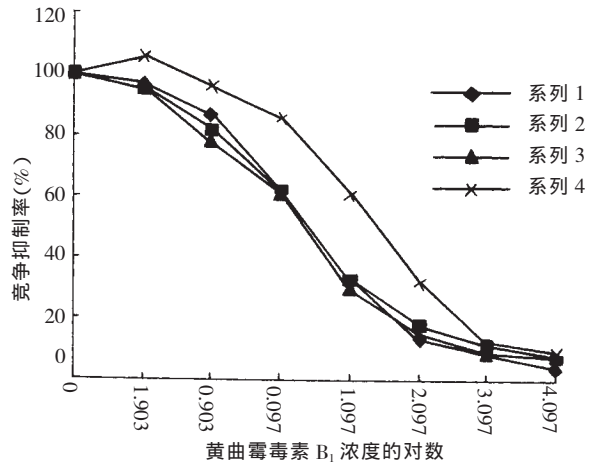


图 7-21 不同浓度的脱脂奶粉封阻剂的 ELISA 竞争抑制曲线

系列 1. 9% 的脱脂奶粉 系列 2. 5% 的脱脂奶粉
系列 3. 3% 的脱脂奶粉 系列 4. 1% 的脱脂奶粉

F.ELISA 竞争抑制曲线 (competitive inhibitory curve of ELISA), 以 AFB₁ 标准物溶液中的 AFB₁ 的浓度对数为横坐标, 以不同 AFB₁ 浓度所对应的吸光值和 AFB₁ 浓度为零时吸光值的比值的百分数 (称为竞争抑制率) 为纵坐标, 绘制 ELISA 竞争抑制曲线。根据样品抽提液的吸光值, 利用竞争抑制曲线, 计算出样品中 AFB₁ 的含量。

上述 ELISA 的操作过程见图 7-22。

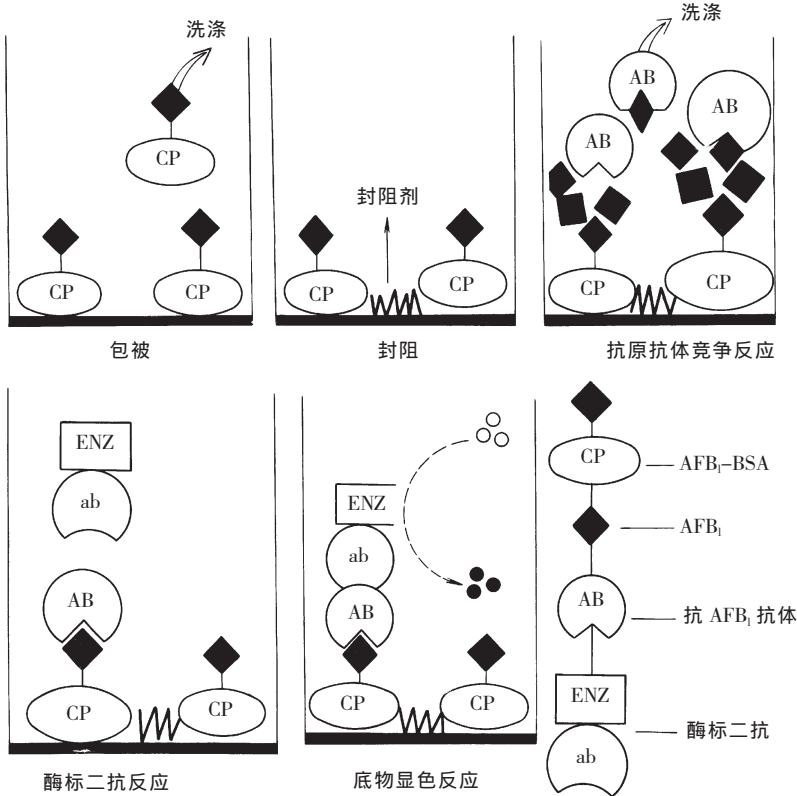
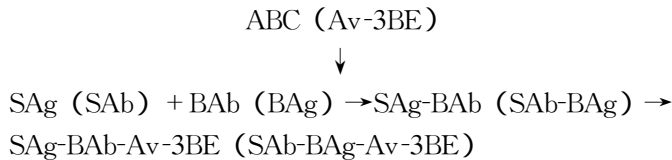


图 7-22 间接竞争 ELISA 测定 AFB₁ 的过程

(4) ELISA 的进展。ELISA 自从其诞生以来就不断地得到改良, 特别是在操作过程的自动化和提高灵敏度等方面取得了很大的进展。关于 ELISA 操作过程的自动化将在本节随后的内容中叙述。在灵敏度方面, ELISA (包括其他酶免疫方法) 的灵敏度依赖于免疫反应试剂 (主要是抗体) 的特异性 (specificity) 与亲和力 (affinity)、酶结合物的比活度 (specific activity, 在酶活性一定的情况下主要是酶的结合量) 和酶反应产物的可检测极限 (detection limit) 三方面的因素。近几年来, 围绕后两个因素开展了大量的研究, 各种放大系统被引入 ELISA 中, 大大提高了 ELISA 的灵敏度, 拓宽了其检测范围, 而且放大系统的引入并没有增加 ELISA 的操作难度, 只是在常规 ELISA 的基础上做了一些增添和改进, 目前这些方法正逐渐成为 ELISA 的主流方法, 代表着 ELISA 的发展方向。下面介绍几种应用 ELISA 中的放大系统及其衍生的 ELISA。

① 生物素-亲和素系统 (biotin-avidin system, BAS): 本系统是通过提高酶结合物的比活度,

即酶的结合量来实现检测信号的放大,从而提高 ELISA 灵敏度。亲和素 (avidin) 是卵白蛋白中提取的一种碱性糖蛋白,对生物素 (biotin, 是复合维生素 B 系统中的一小分子的水溶性因子) 有很高的亲和力,每个亲和素分子可以和四个生物素分子结合,而生物素非常容易和抗体或酶等蛋白质结合,一个分子的抗体或酶的蛋白质可以和多个生物素分子结合,并且生物素和蛋白质结合后并不影响它和亲和素的亲和力。这样通过 BAS 可以将大量的酶标记物结合在抗原抗体复合物上,从而增加检测信号的强度,提高灵敏度。目前 BSA 在 ELISA 中得到了广泛的应用,下面以 ABC 试剂为例,就 BSA 进行叙述。ABC 是 avidin biotin complex (亲和素生物素复合物) 的缩写,它是由亲和素和酶标生物素按一定比例混合的试剂。在 ABC 中一个分子的亲和素和三个分子的酶标生物素结合形成复合物。在 ABC 的 ELISA 中,首先将生物素标记的抗原或抗体与相应的固定于酶标板微孔内的抗体或抗原进行反应,然后加入 ABC 试剂,试剂复合物中的亲和素通过生物素与标记的抗原或抗体结合,从而将标记在生物素上的大量的酶引入抗原抗体反应中,增加信号强度,实现放大作用。这一过程可以用反应式表示如下:



式中 SAg 表示固定化的抗原, SAb 表示固定化的抗体, BAg 表示生物素标记的抗原, BAb 表示生物素标记的抗体, Av 表示亲和素, BE 表示酶标记的生物素, Av-3BE 表示一个亲和素分子和三个酶标志的生物素分子结合。

由于亲和素是 pI 值较高的糖蛋白,对以聚苯乙烯为材料的酶标板等有较高的非特异性吸附,因此在 BAS 的 ELISA 中常常容易出现一些假阳性。最近一种由阿维丁链霉菌 (*Streptomyces avidinii*) 产生的蛋白质,具有和亲和素相似的性质,被称为链亲和素 (streptavidin), 它的 pI 仅为 6.0, 其非特异性吸附远远小于亲和素的,因此近年来日益受到重视,有取代亲和素之势。

② 荧光酶免疫分析 (fluorescence enzyme immunoassay): 是通过提高酶反应产物的可检测极限来提高 ELISA 灵敏度的。将荧光底物取代 ELISA 中的普通底物, 荧光底物在酶的催化下产生荧光, 通过测定荧光的强度来测定抗原抗体的反应, 这样可以大大地提高 ELISA 的灵敏度。主要原因是, 通常的 ELISA 是通过比色测定酶反应产物颜色的深浅来衡量抗原抗体的反应情况, 比色测定的极限约为 $10^{-3} \mu\text{g/mL}$, 比色的光密度也限定在 0.001 或 0.01~2.0 之间, 这些都限制了一般 ELISA 灵敏度; 而在荧光酶免疫分析 (荧光 ELISA) 中, 荧光的测定极限可以达到 $10^{-6} \mu\text{g/mL}$, 这比比色的测定极限降低了三个数量级, 而且荧光的测定范围也远远大于比色的测定范围, 这些都使得荧光 ELISA 的灵敏度高于普通 ELISA。

目前 ELISA 中常用的三种酶, 辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶 (AP) 和 β -D-半乳糖苷酶 (BG) 都有相应的荧光底物, 测定荧光强度的仪器也得到了很大的改进, 荧光酶免疫技术正越来越被广泛地采用。

③ 化学发光酶免疫分析 (chemiluminescence enzyme immunoassay): 和荧光酶免疫分析一样, 化学发光酶免疫分析也是通过提高酶反应产物的可检测极限来提高 ELISA 灵敏度的一种方法。本方法通过将化学发光的物质引入酶免疫分析中, 通过测定光强来分析抗原抗体的反应。和一般

的酶免疫方法 (ELISA) 相比, 测定光强可以提高灵敏度。

除了上述几种提高 ELISA 灵敏度的方法外, 通过酶级联放大和酶-抗酶抗体复合物系统也可以提高 ELISA 的灵敏度。酶级联放大的原理在本章的第二节已经讲过; 关于酶-抗酶抗体复合物系统, 本节前面叙述的 PAP 就是典型的酶-抗酶抗体复合物系统。

(三) 免疫沉淀反应

免疫沉淀反应 (immunological precipitation reaction) 是将可溶性抗原 (例如蛋白质、多糖、类脂或它们的复合物) 与相应抗体在适量的电解质存在的条件下发生特异性结合, 形成抗原抗体复合物并出现肉眼可见的沉淀, 这种沉淀只有在抗原抗体比例适合时才能形成, 在固体 (或半固体) 载体中这种沉淀表现为沉淀线, 在液体中则常表现为絮状物。根据反应载体和反应现象的不同, 免疫沉淀反应大致可以分为环状免疫沉淀反应 (ring immunological precipitation reaction), 絮状免疫沉淀反应 (flocculation immunological precipitation reaction) 和琼脂免疫扩散 (agar diffusion) 三种。

环状免疫沉淀反应通常是已知的抗体 (抗血清) 放入试管的底部, 然后将适当稀释的抗原小心加入试管中, 使两种溶液成为界面清晰的两层, 经过一定时间后, 如果抗原和抗体相对应, 那么在两层液面间可以看见环状乳白色沉淀带, 如果抗原抗体不对应则不出现沉淀带。环状免疫沉淀反应被广泛用于法医的血迹鉴定和食物掺假的识别。

絮状免疫沉淀反应是将可溶性抗原和抗体溶液在试管中或凹玻璃板上混匀, 反应, 如果抗原抗体对应则可见絮状沉淀, 反之则不出现絮状沉淀。絮状免疫沉淀反应主要用于血清型鉴定和病原菌的诊断等方面。

琼脂免疫扩散是以琼脂凝胶为沉淀的载体, 可溶性抗原和抗体在载体上扩散相遇, 如果抗原抗体对应, 并且两者的浓度比例适当, 那么就能形成肉眼可见的沉淀带, 反之则不出现沉淀带。如果将抗原抗体的扩散作用和电泳结合起来, 则可以衍生出多种免疫电泳技术。

免疫沉淀反应由于灵敏度较低, 因此通常仅作为定性 (或半定量) 分析方法, 应用于病原菌检测和鉴定中。在食品安全检测中, 免疫沉淀反应主要用于对食品中污染病原菌的定性测定和鉴别。

最近, Biocontrol Systems 公司生产了一种 “1-2 实验” (1-2 test) 装置, 用于对产鞭毛的沙门氏菌的检测和鉴别。该装置的基本结构见图 7-23, 下面对该装置进行说明。为了便于叙述, 将该装置分为两部分, 第一部分内含半固定状态的琼脂培养基, 供抗原抗体的扩散和反应; 第二部分内含有沙门氏菌的选择性增菌液——四硫磺酸钠煌绿增菌液, 供沙门氏菌的增殖, 首先将可疑的菌落或食品等样品的增菌液接种于第二部分的培养基中, 并将抗沙门氏菌鞭毛抗体加入第一部分上部的抗体槽中, 然后如图示将其垂直放置于 35℃ 培养箱中培养 14~30h, 如果可疑的菌落是有鞭毛的沙门氏菌或样品的增菌液中含有带鞭毛的沙

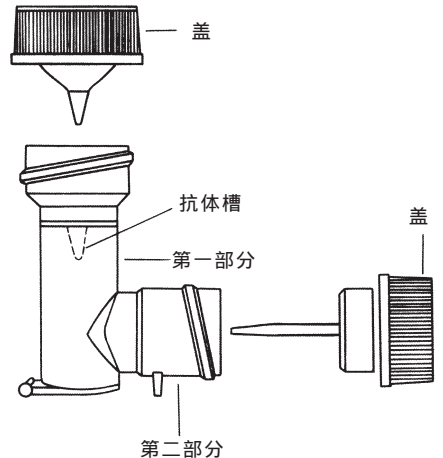


图 7-23 “1-2 实验”装置

门氏菌，那么经第二部分中的培养基增殖后的沙门氏菌通过游入第一部分的琼脂中，并和其中的抗体反应结合形成沉淀带，反之，如果没有带鞭毛的沙门氏菌则不出现沉淀带。

(四) 免疫凝集反应

免疫凝集反应 (immunological agglutination reaction) 是经典的血清学方法，是颗粒抗原 (例如细菌、血红细胞等) 或可溶性抗原 (抗体) 结合于不溶性的载体微粒上后与相应的抗体 (抗原) 在适当的条件下，经一定时间后凝集成肉眼可见的凝聚物的反应。颗粒抗原与相应抗体产生的凝集反应通常称为直接凝集反应，而将可溶性抗原或抗体结合于不溶性颗粒载体后再与相应的抗体或抗原发生的凝集反应称为间接凝集反应。间接凝集反应克服了颗粒抗原的局限，因此大大拓宽了凝集反应的范围，是近十多年来凝集反应中的研究热点。

用于间接免疫凝集反应的载体包括血红细胞 (red blood cell, RBC)、富含葡萄球菌 A 蛋白 (staphylococcal protein A, SPA) 的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的菌体、乳胶 (latex particle)、胶体金 (colloidal gold)、磁珠 (magnetic particle) 等，这些载体已作为商品试剂很多生物制品公司都有售，也可以自己制备。

血红细胞可以来自于人的血液也可以来自于别的动物，采血时为了防止血液凝固，应预先加入抗凝血剂，然后离心即可获得血红细胞。对于可溶性的多糖抗原，它能够直接吸附在血红细胞上，对蛋白质类的抗原或抗体则必须以戊二醛等作为交联剂才能连接 (包被) 在血红细胞上。

SPA 是金黄色葡萄球菌的一种表面蛋白质，它能非特异性地结合在 IgG 的 Fc 片段上，而不影响抗体与抗原的结合。首先培养收集富含 SPA 的金黄色葡萄球菌 (例如 Cowan I 菌株) 的菌体，然后将菌体和抗血清 (抗体) 适当稀释后混合反应，即获得包被有 IgG 的金黄色葡萄球菌的菌体。

乳胶是聚苯乙烯的微粒溶液，由于静电的作用，微粒悬浮于溶液中呈乳白色，这种微粒可以直接吸附抗原或抗体，也可以先将羧基 ($-\text{COOH}$) 引入微粒上，再通过羧基将抗原或抗体包被在微粒表面。

胶体金是氯金酸 (HAuCl_4) 在白磷、抗坏血酸或柠檬酸三钠等还原剂的作用下聚合成一定大小的颗粒，形成一种带负电荷的疏水胶体溶液。它通过吸附作用将 IgG 等大分子物质包被在其表面。

磁珠是超级顺磁 (superparamagnetism) 的 Fe_3O_4 颗粒，它能够吸附抗体等物质，并在磁场的作用下移动聚集。也可以在磁珠的表面包裹一层聚苯乙烯从而增加它对抗体等蛋白质的吸附能力。

虽然间接免疫凝集反应的载体种类很多，具体的操作过程也有一些差异，但是它们的基本原理是相同的。首先将抗原或抗体吸附 (包被) 在载体微粒上，然后和相应的抗体或抗原直接或间接反应，通过抗原抗体反应的交联作用将多个载体微粒联系在一起，从而加速它们的絮凝和沉淀。根据凝集颗粒的大小和形态等特点，结合标准样品作对照，可以对样品中待检测的抗原或抗体进行定性或半定量分析。这一过程见图 7-24。

(五) 其他免疫学方法

由于世界经济的全球化，食品的生产规模越来越大，食品的流通越来越频繁，食品安全性事件的影响面也越来越大。近几年来相继发生的“大肠杆菌 O_{157} 流行事件”、“二噁英事件”、“疯牛

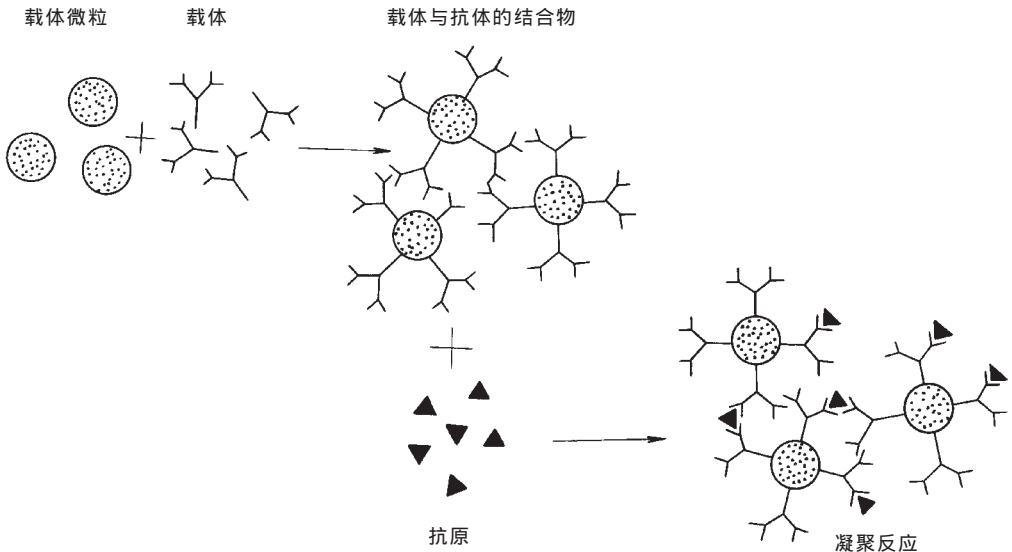


图 7-24 间接凝集反应示意图

病事件”和口蹄疫的流行爆发都说明了这一点。这些事件的发生也使食品的安全性问题正受到前所未有的关注。为了确保食品的安全，世界各国都采取了或正在采取各种措施，美国等西方国家近年来每年都拨出专款来加强对食品安全的研究，其中加强对食品的安全检测方法的研究是非常重要的内容。由于现有的很多检测方法存在着检测时间长、操作麻烦、需要昂贵的仪器设备和灵敏度较差等缺陷，显得越来越不能适应当前的食品生产、流通和销售，因此各种新的检测方法不断涌现。免疫学方法由于具有特异、灵敏和快速等特点而愈来愈受到重视，目前主要是从提高检测方法的灵敏度、缩短检测时间和实现检测过程的自动化等几个方面来改良和开发免疫学方法。

在提高免疫检测方法的灵敏度方面，前面叙述的将生物素-亲和素系统、荧光分析和化学发光分析等引入 ELISA 中就是最好的例证。

在食品的生产、安全检测和日常生活中，很多情况下，人们常常需要迅速地知道食品中的某种（些）有害物质是否超标，而并不需要知道这些有害物质具体的量，这就促使了一些快速、灵敏、操作简便的免疫学检测方法的诞生。最近几年 Biocontrol 公司和 Neogen 公司相继先后推出了沙门氏菌 (*Salmonella* spp.)、李斯特菌 (*Listeria* spp.)、大肠杆菌 O₁₅₇:H₇ (*Escherichia coli* O₁₅₇:H₇)、弯曲杆菌 (*Campylobacter* spp.) 的快速免疫检测试剂条 (test strip); Charm 公司等推出了快速检测黄曲霉毒素的试剂条。这些检测产品的推出大大地缩短了检测时间，有的检测方法，例如 Charm 公司生产的牛奶中黄曲霉毒素 M₁ (AFM₁) 的检测试剂条，仅需 5~10min 就可以知道检测出牛奶中 AFM₁ 的含量是否超标，而且操作过程简单，检测结果凭肉眼就可以判断，非常适合于在生产和销售现场进行检测和分析。

检测试剂条虽然形状各异，但是它们的基本组成和检测原理是相同的。它们通常以长条状的硝酸纤维素膜为支撑物，被胶体金标志的抗体吸附（黏附）于膜的一端，其前方有一样品孔（槽），在膜的另一端分别有一条对照带和反应带（在没有反应前这两条带通常是看不见的）（图

7-25)。使用时,将一定量(通常 $100\mu\text{L}$ 左右)的样品提取液或微生物的富集液加入样品槽中和胶体金标志的抗体反应,并沿纤维素膜向另一端移动扩散,与反应带和对照带反应显色,比较反应带和对照带的颜色深浅就可以判断出食品样品中是否含有某种有害物质(微生物)或其含量是否超标。以 Neogen 公司生产的大肠杆菌 $O_{157}:H_7$ 的检测试剂条为例,如果只出现对照带则表明样品中不含大肠杆菌 $O_{157}:H_7$; 如果对照带和反应带都出现则表明样品中含有大肠杆菌 O_{157} ; 如果仅出现反应带或者什么带都不出现,那么表明试剂条已过期或变质不能再用,或实验的操作不同应继续实验。在判读 Charm 公司生产的检测牛奶中 AFM_1 含量试剂条的结果时,情况和上述不同,反应结束后,如果对照带和反应带都出现,且反应带的颜色和对照带的颜色一样深或更深,则表明样品中的 AFM_1 含量没有超标; 如果反应带的颜色比对照带的浅或不出现反应带,那么则表明样品中的 AFM_1 超标; 如果对照带没有出现则说明试剂条已变质不能使用,或操作不当应继续实验(图 7-25)。上述在结果判断时的差异,主要是由于对照带和反应带的组成成分不同,在实际的实践中,应仔细阅读产品的说明书。

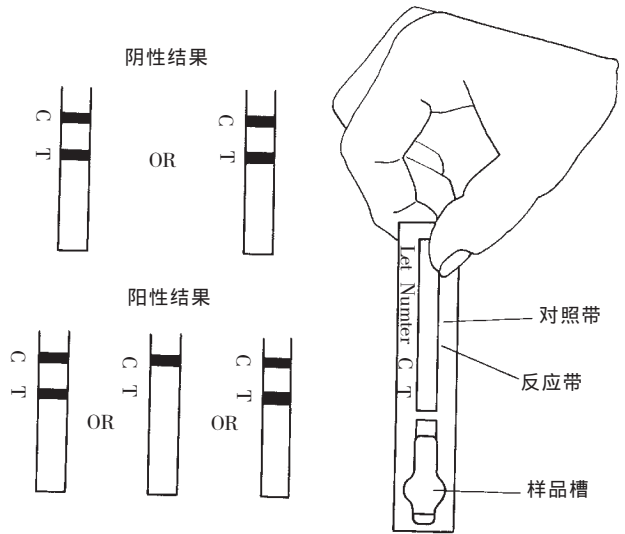


图 7-25 免疫检测试剂条

另外,在快速检测方面, Clover 公司推出了快速检测金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌的乳胶检测试剂, 2min 就可以得出结果。1998 年, 陈福生等研制出食品中黄曲霉毒素 B_1 的胶乳快速检测方法, 该方法将抗黄曲霉毒素 B_1 的抗体包被于胶乳颗粒上, 以黄曲霉毒素 B_1 标准样为参照, 能够在 5~10min 内, 判断出食品中的黄曲霉毒素 B_1 含量是否超标, 该方法已申请发明专利。

在免疫检测方法的自动化方面, 近些年来出现了很多自动化的免疫分析仪器, 例如 BioMerieux 公司推出的 VIDAS 自动化免疫检测仪。它的工作原理是将荧光酶联免疫分析所需的所有试剂预先分装在同一试剂条的不同孔内, 然后由仪器自动完成整个分析检测的全过程, 加入样品后, 无需再进行人工操作, 60min 左右就可以给出结果。

另外, 将抗原抗体的特异性反应特性和相应的仪器相结合实现检测的自动化也是免疫学方法发展的趋势。本章第一节叙述的免疫传感器就是一个典型的例子。

三、免疫技术在食品安全检测中的应用

免疫技术在食品污染细菌及其毒素检测、污染真菌及其毒素检测、农药残留检测和食品掺假识别等食品安全检测和分析中都得到了应用。

(一) 免疫技术在食品污染细菌及其毒素检测方面的应用

很早以前,免疫学技术在细菌的病原性和血清型检测与鉴定方面就得到了广泛的应用。在食品安全方面,常见的污染的食品病原细菌,例如沙门氏菌(*Salmonella* spp.)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、李斯特菌(*Listeria* spp.)、弯曲杆菌(*Campylobacter* spp.)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、气单胞菌(*Aeromonas* spp.)、志贺氏菌(*Shigella* spp.)、耶尔森氏菌(*Yersinia* spp.)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)等,都可以通过免疫学方法进行分析 and 检测。病原微生物产生分泌于食品中的毒素,例如金黄色葡萄球菌产生的肠毒素(enterotoxin)、肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)产生的肉毒毒素(botulinum toxin)、大肠杆菌肠毒素和产气荚膜梭菌产生的产气荚膜梭菌毒素(*Clostridium perfringens* toxin)等等,也可以用免疫学方法来检测和分析。检测上述病原菌及其毒素的免疫学方法包括免疫沉淀法、免疫絮凝法、放射免疫分析方法和酶免疫分析方法等各种免疫学方法。

(二) 食品中污染真菌及其毒素的免疫分析

食品中污染真菌的免疫学分析方法的研究起步较晚,开始于20世纪80年代中期,但是食品中常见的污染真菌的免疫学检测方法大都被研究过。据有关文献资料,到目前为止,食品中常见的污染真菌,已有地霉属(*Geotrichum*)、根霉属(*Rhizopus*)、青霉属(*Penicillium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、链格孢霉属(*Alternaria*)、毛霉属(*Mucor*)、拟茎点青霉属(*Phomopsis*)、分枝霉属(*Cladosporium*)、腐质霉属(*Humicola*)、散囊菌属(*Eurotium*)、镰孢霉属(*Fusarium*)等十多个属被研究过,并获得了相应的特异性抗原和抗体。

1986年Lin和Cousin等人,以番茄汁中常见的污染菌链格孢霉(*Alternaria alternata*)、白地霉(*Geotrichum candidum*)、匍匐根霉(*Rhizopus stolonifer*)为研究对象,以它们冷冻干燥菌丝为抗原,通过免疫兔子获得特异性抗体,ELISA试验结果的交叉反应率小于10%,最小检出量达到1微克干菌丝/克样品,无背景干扰,ELISA检测结果和番茄汁中这些菌的菌丝体的含量有较好的相关性,因而他们认为所获得的抗体能用于番茄汁中这些污染真菌的定性和定量检测。次年他们仍然以这几个菌种所获得的抗体与污染果蔬产品、面包、奶酪、粮食等的链格孢霉、白地霉、匍匐根霉、镰孢霉、木霉(*Trichoderma* spp.)、腐霉(*Pythium* spp.)、腐皮根肿菌(*Rhizoctonia solani*)、指状青霉(*Penicillium digitatum*)、汉逊氏酵母(*Hansenula uvarum*)、明胶红酵母(*Rhodotorula glutinis*)、月桂烷隐球酵母(*Cryptococcus laurenii*)等不同种属总共近30个菌株进行交叉试验,发现虽然存在一定程度的交叉反应,但还是有相当的特异性,而且背景影响小,可以用于检测相应的污染真菌。他们还将ELISA的结果与Howard计数结果相比较,证明它们之间有很好的相关性,并证明多糖是其特异性抗原。

1988年Notermans等人以各种坚果以及坚果混合物为试验样品,以真菌的胞外多糖为抗原,运用ELISA分析了污染它们的曲霉属(*Aspergillus*)、根霉属(*Rhizopus*)、分枝霉属(*Cladosporium*)、毛霉属(*Mucor*)和青霉属(*Penicillium*)等属的真菌,并和常规的霉菌平板菌落计数法相比较,发现ELISA更能准确反映食品中这些真菌的污染程度,而平板计数法则在样品处理过程中对真菌的影响较大,因而不能很准确地反映污染情况。

1990年Dewey等人以污染谷物的产毒青霉——岛青霉(*P. islandicum*)为研究对象,将其

新鲜的固体表面培养物的浸提液注射小白鼠，按单克隆抗体制备技术获得特异性单克隆抗体，以此单克隆抗体对东南亚地区仓储粮食中的污染真菌进行检测，发现在印度尼西亚采集的霉变样品中有 90% 的样品含有岛青霉。而在变色粮食中，印度尼西亚和菲律宾的岛青霉检出率分别为 32% 和 14%，这些结果都比表面消毒粮食直接计数法（direct plating of surface-sterilized grains）的检出率高，主要原因是 ELISA 的灵敏度较高。

1999 年陈福生等报道了以 ELISA 检测稻谷、小麦和玉米等粮食中污染曲霉的含量，研究表明检测结果与平板计数的结果有很好的相关性。

相关的研究报道还有很多，1989 年 Dewey 等人以单克隆抗体检测谷物中的 *Humicola langinosa* 污染真菌。1991 年 Ricker 等人用 ELISA 方法定量分析了成熟葡萄中灰色葡萄孢菌（*Botrytis cinerea*）的污染情况。

食品中污染真菌毒素免疫检测方法的研究起步较早，开始于 20 世纪 60~70 年代，起初用于真菌毒素的免疫学检测方法是放射免疫方法。由于放射免疫方法的诸多缺点，逐渐被酶免疫方法所取代，目前真菌毒素的检测方法主要是酶免疫方法，20 世纪 80 年代中后期已有酶免疫检测真菌毒素的商品试剂盒销售。目前食品中常见的污染真菌毒素，例如，黄曲霉毒素（aflatoxin）、赭曲霉毒素（ochratoxin）、玉米赤霉烯酮（zearalenone）、T-2 毒素（T-2 toxin）、HT-2 毒素（HT-2 toxin）、串珠镰刀菌毒素（moniliformin）、脱氧雪腐镰孢霉烯醇（deoxynivalenol）、杂色曲霉毒素（sterigmatocystin）、伏马素（fumonisin）、橘霉素（citrinin）和展青霉素（patulin）等都有商品试剂盒出售，用以检测玉米、稻谷、大米、花生、小麦、大麦、棉子、牛奶、肉类及其制品等中污染的各种真菌毒素。近几年来真菌毒素的快速检测方法和试剂也相继问世，前面叙述的 Charm 公司生产的黄曲霉毒素的检测试剂条和 1998 年陈福生等研制的食品中黄曲霉毒素 B₁ 的胶乳快速检测方法都属于快速检测方法。

（三）食品中农药残留的免疫学方法检测

食品中的农药残留包括农用抗生素残留、除草剂残留和有机磷、有机氯与氨基甲酸酯类等杀虫剂的残留。免疫学方法用于食品中农药残留检测和分析的研究大约开始于十多年前，目前农药残留的检测手段主要是毛细管气相色谱和高效液相色谱及其联用技术。但是免疫学方法由于具有快速、灵敏、特异、操作简便、无须昂贵的仪器设备和可以在采样现场分析等优点，已成为当今农药残留检测技术的主要发展方向之一，越来越受到人们的重视。

（四）食品中抗生素残留的免疫检测

食品中的抗生素残留主要来自于两个方面，一是农用抗生素，二是畜用抗生素。食品中抗生素残留的分析检测方法很多，主要有薄层层析（TLC）、液相色谱（LC）、气相色谱（GC）、气质联用（GC/MS）、微生物抑制实验（microbial inhibition test）、微生物受体实验（microbial receptor test）、免疫学方法（immunological method）以及这些方法相互结合在一起的衍生方法，例如微生物抑制实验和液相色谱结合在一起的所谓生物色谱（biochromatography）。免疫学方法作为其中的一种检测方法，近年来愈来愈受到重视。目前德国的 r-biopham 公司和意大利的 Tecnalab 公司等已有检测食品中磺胺类抗生素、氯霉素、链霉素、四环素、新霉素、泰乐菌素和庆大霉素等抗生素残留的免疫检测试剂盒出售。

（五）食品中掺假物的免疫学识别

免疫学方法在识别食品中掺假物方面也发挥着重要的作用。例如在绵羊奶或山羊奶奶酪的生产中,如果原料奶中掺杂有牛奶成分将影响绵羊(山羊)奶奶酪的品质和加工特性,因此在加工过程中应避免牛奶的掺入。通常的分析方法,包括电泳技术一般很难鉴别出羊奶中是否掺杂有牛奶。以牛奶中特有的酪蛋白为抗原,制备抗体,然后再运用免疫学方法就能够很容易地鉴别出羊奶中是否掺杂有牛奶。由于牛奶中特有的酪蛋白的耐热性好,因此免疫学方法对于杀菌或消毒后的奶及其乳酪制品中是否含有牛奶成分也可以进行分析和鉴别。同样原理的免疫学方法也可以快速鉴别绵羊奶中是否掺杂有山羊奶。目前德国的 r-biopham 公司已有上述免疫试剂盒销售。

另外,免疫技术对食品中是否掺杂有激素、罂粟碱(壳)和肉制品中是否掺杂有非肉蛋白等等也可以进行快速的分析和鉴别。

(六) 免疫学方法在分析样品净化中的应用

免疫学方法除了可以用于分析检测食品中的有毒有害物质外,也可以用于分离纯化食品中这些物质。通常情况下,食品中的有毒有害物质的含量是微量甚至痕量的,而食品本身的组分非常复杂,因此在分析这些成分时,往往要采用各种试剂从食品中将它们提取分离出来,并加以净化,这些过程所需要的时间和费用,通常占整个样品分析时间和费用的大部分。依据抗原抗体的特异反应特性,应用免疫学方法可以快速地分离净化所要分析的成分,然后再进行分析。例如, VICAM 公司的净化真菌毒素的免疫亲和层析柱,就是先将抗黄曲霉毒素、伏马素、T-2 毒素或赭曲霉毒素的抗体包被在葡萄糖凝胶或琼脂糖凝胶颗粒上,然后将它们装入小柱内制成的,它们具有从样品中快速分离纯化这些真菌毒素的作用。使用时将样品的提取液加入亲和柱中,并依次用不同的洗脱剂洗脱,就可以得到纯净的真菌毒素,经过净化后的毒素可以用免疫学方法或 HPLC 等进行分析和测定。经过亲和柱净化后可以大大地提高检测方法的灵敏度,减少样品杂质对分析的干扰,提高分析结果的准确性。

第三节 分子生物学技术及其在食品安全检测中的应用

分子生物学是在分子水平研究生物的结构、组织和功能的科学。分子生物学这一术语的来源可以追溯到 1950 年 Astburg 在 Harvey 演讲中的用语,1953 年 Waston 和 Crick 提出 DNA 双螺旋模型标志着分子生物学的创立,自此分子生物学进入快速发展的道路,随后提出了 DNA 复制、转录和翻译的中心法则,同时逆转录现象也被发现。进入 20 世纪 70 年代,随着限制性内切酶的发现和 DNA 杂交技术的建立,分子生物学进入技术化时代。之后分子生物学技术发展迅速,各种分子生物学技术不断出现,概括起来分子生物学技术主要包括核酸分子杂交技术、PCR 技术和重组 DNA 技术等。目前分子生物学技术被广泛地应用于生物科学的各个领域,近些年来分子生物学技术在食品安全检测和分析等方面也得到了较好的应用。

一、食品安全检测中常用的几种分子生物学技术简介

分子生物学技术主要包括核酸分子杂交 (molecular hybridization of nucleic acids)、PCR

(polymerase chain reaction, PCR) 和 DNA 重组 (recombinant DNA) 等。其中 DNA 重组在食品安全检测中的应用很少, 其内容在本书的第二章已有较为详细的叙述, 因此在这里将主要介绍食品安全检测和分析中常用的分子杂交和 PCR。

(一) 分子杂交技术

核酸分子杂交是指具有一定同源序列的两条核酸单链在一定条件下按碱基互补配对原则形成异质双链的过程。核酸分子杂交是分子生物学领域中应用最为广泛的技术之一, 它具有灵敏度高、特异性强等优点, 主要用于特异 DNA 和 RNA 的定性和定量检测。作为研究核酸的有力工具, 分子杂交被广泛地应用于农业、医学、军事和食品安全检测等诸多领域。

1. 分子杂交的原理和分类

(1) 原理。DNA 和 DNA 单链之间、DNA 和 RNA 单链之间或两条 RNA 链之间, 只要具有一定的互补碱基序列就可以在适当的条件下相互结合形成双链。在这一过程中, 如果一条链是已知的 DNA 或 RNA 片段, 那么依据碱基互补配对原则就可以知道和它互补的另一条链的组成, 这样就可以用已知的 DNA 或 RNA 片段来检测和其配对的未知 DNA 或 RNA 的片段的组成, 这就是核酸分子杂交的原理。其中已知的 DNA 或 RNA 片段被称为探针 (probe), 它可以是用基因克隆技术分离获得的特异的 DNA 序列, 或特异的 DNA 序列在体外转录获得的 RNA 序列, 或 mRNA 逆转录得到的 cDNA (complementary DNA) 序列, 也可以是人工合成的寡核苷酸片段。为了检测的方便, 探针常常需要进行标志, 即和放射性同位素或其他非放射性物质结合, ^{32}P 、 ^3H 和 ^{35}S 是常用的放射性同位素, 非放射性物质包括生物素、地高辛和荧光素等。

(2) 分类。分子杂交时, 如果被检测的 DNA 或 RNA 片段和探针均在溶液中进行反应, 那么这种杂交被称为液相杂交 (liquid hybridization); 如果一方固定于固相支撑物 (如尼龙膜或硝酸纤维素膜) 上, 另一方在溶液中则称为固相杂交 (solid hybridization)。和固相杂交相比, 液相杂交的反应条件均一, 各种反应参数容易确定, 反应速度快, 因此便于杂交反应动力学的理论研究。因实验目的的不同, 液相杂交的反应条件和操作过程各不相同, 没有一个固定的实验条件和操作程序, 另外液相杂交在食品安全检测中也很少应用, 因此在以下的叙述中将仅介绍固相杂交的情况。

根据支撑材料的不同, 固相杂交可以分为原位杂交 (hybridization in situ) 和膜杂交 (membrane hybridization)。前者是指杂交时, 不需要从组织或细胞中提取核酸, 不改变核酸原来的位置, 探针直接和细胞或组织切片中的核酸进行杂交, 可以对细胞或组织切片中的 DNA 或 RNA 进行精确的定位和定量。膜杂交是指探针和固定在膜上的核酸进行杂交。膜杂交是目前最常用的一种核酸分子杂交方法, 根据核酸种类的不同和操作过程的差异, 膜杂交又可以分为 Southern 印迹杂交 (Southern blotting hybridization)、Northern 印迹杂交 (Northern blotting hybridization) 和斑点印迹或窄缝印迹杂交 (spot or line blotting hybridization)。Southern 印迹杂交即 DNA 印迹杂交, 被分析的核酸为 DNA; Northern 印迹杂交被分析的核酸为 RNA; 而斑点印迹杂交或窄缝印迹杂交是将粗制的或纯化的核酸样品处理后直接点于膜的表面, 再与标志的探针进行杂交的方法, 斑点印迹为圆形, 窄缝印迹为线形。与 Southern 印迹杂交和 Northern 印迹杂交相比, 斑点印迹杂交或窄缝印迹杂交具有简单、快速、灵敏、样品集中且用量少等优点, 可用于基因组中特异基因及其表达的定性和定量研究。核酸分子杂交的分类见

图7-26。

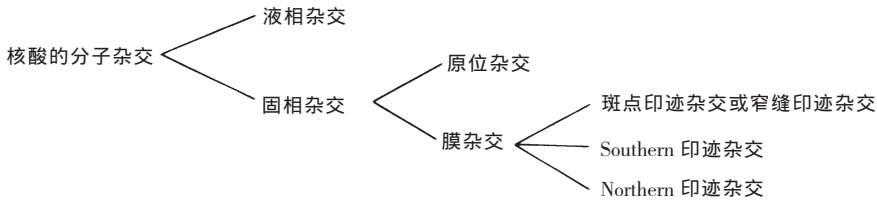


图 7-26 核酸分子杂交的分类

2. 膜杂交的基本过程 如前所叙，液相杂交没有一个较为固定的操作过程，固相杂交中的原位杂交和斑点印迹杂交或窄缝印迹杂交的操作过程比较简单，在这里主要介绍膜杂交中 Southern 印迹杂交和 Northern 印迹杂交的基本的过程。

(1) 核酸的制备(nucleic acids preparation)。通过一定的方法获得具有相当纯度和完整的核酸是核酸分子杂交的前提。在具体的核酸提取过程中，因试验材料和试验目的的不同，应注意的问题也各不相同，但是都必须注意的问题是要尽可能地抑制DNase和RNase的活性，防止它们在提取过程中对DNA和RNA的降解。获得核酸后，对于Southern印迹杂交，应采用限制性内切酶彻底消化（分解）DNA，如果酶解不完全，就可能出现比实际数目更少或片段更长的杂交区带，从而导致错误的结论；对于Northern印迹杂交，应采用甲醛、乙二醛或羟基汞等变性剂处理RNA，使其二级结构解体，从而使其在电泳时能严格按照分子量大小分布。

(2) 电泳 (electrophoresis)。采用琼脂糖凝胶电泳将待测核酸片段分离，根据核酸片段的大小，琼脂糖凝胶的浓度可以为 0.5% ~ 1.5%，大片段的核酸采用低浓度，小片段的核酸采用高浓度。

(3) 印迹 (blotting)。所谓印迹就是将电泳分离后的琼脂糖凝胶中核酸片段转移到尼龙膜或硝酸纤维素膜上的过程。转移后核酸片段保持相对的位置不变。印迹的方法包括虹吸印迹 (siphoning blotting)、电泳印迹 (electrophoretic blotting) 和真空印迹 (vacuum blotting) 三种。所谓虹吸印迹是利用毛细管的虹吸作用由印迹缓冲液带动核酸分子从凝胶上转移到膜上，虹吸印迹装置见图 7-27。电泳印迹是利用电泳作用将核酸从凝胶上转移至膜上的方法，它具有快速、简单和高效等优点，特别适合于虹吸印迹转移不理想的大片段核酸的转移，图 7-28 是电泳印迹装置的纵切面示意图。真空印迹指利用真空泵将印迹缓冲液从上层容器中通过凝胶抽滤到下层真空室中，同时带动核酸分子转移至凝胶下面的膜上。真空印迹方法是近年来兴起的一种简单、快速的核酸印迹方法，图 7-29 是真空印迹的示意图。

为了提高印迹效果，采用虹吸印迹和电泳印迹时，在 Southern 印迹杂交中通常需要先先将凝胶浸泡在稀 HCl 溶液中，使较长的 DNA 分子片段断裂成较小的片段，用蒸馏水漂洗凝胶；之后将凝胶浸泡于碱性溶液中，使双链的 DNA 变性为单链的 DNA，再次水洗凝胶；最后将凝胶浸泡于中和液中，中和一定时间后再进行 Southern 印迹。而在 Northern 印迹杂交中，如果 RNA 片段较大 (>2.5kb)，也需预先将凝胶浸泡于碱性溶液中使其水解为小分子片段。采用真空印迹，核酸的变性可以在印迹的同时完成，因此无须在印迹前对凝胶进行处理。

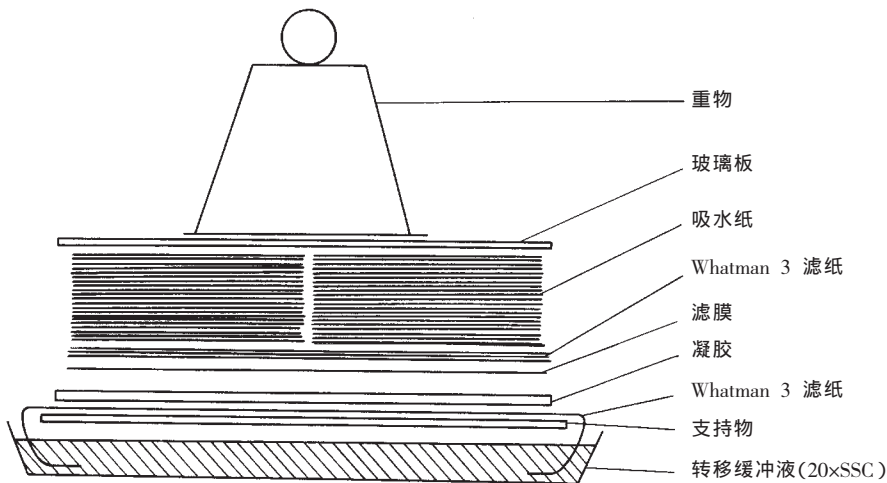


图 7-27 虹吸印迹

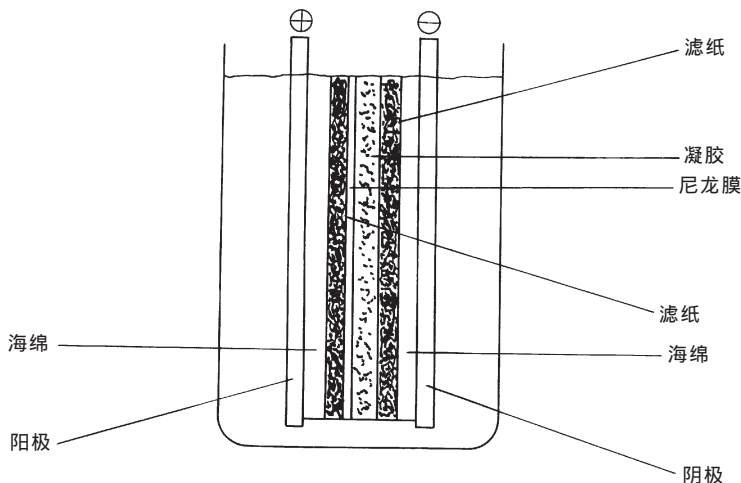


图 7-28 电泳印迹装置的纵切面示意图

(引自卢圣栋)

(4) 预杂交 (prehybridization)。为了减少非特异性的杂交反应，在杂交前应采用适当的封阻剂 (blocking agent) 将核酸中的非特异性位点和杂交膜上的非特异性位点进行封阻，以减少探针的非特异性吸附，从而降低非特异性吸附对杂交结果的影响。常用的封阻剂有两类，一是变性的非特异性 DNA，常用的是鲑鱼精 DNA (salmon sperm DNA) 或小牛胸腺 DNA (calf thymus DNA)；另一类是一些高分子化合物，多采用 Denhardt 试剂 (聚蔗糖 400、聚乙烯吡咯烷酮和牛血清白蛋白)，使用 Blotto 系统 (脱脂奶粉) 效果也很好。

(5) 杂交 (hybridization)。用标记的探针和膜上的核酸进行杂交。杂交时的各种条件 (例

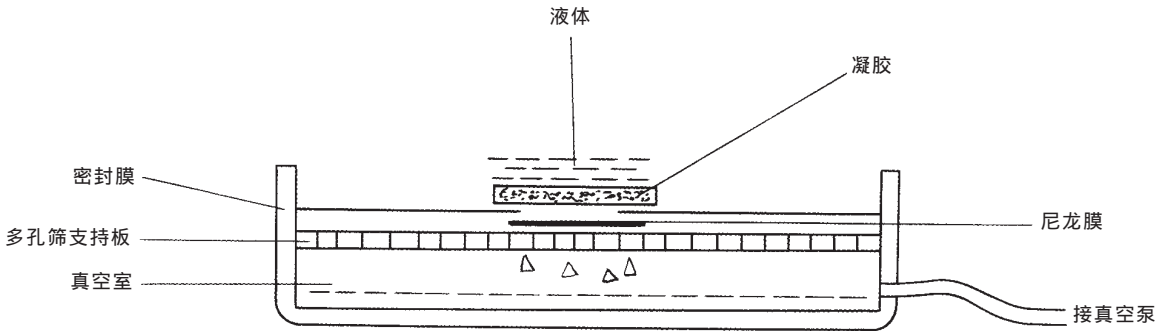


图 7-29 真空印迹示意图

(引自张₃、董君坦)

如，温度、时间、离子强度、探针的长度和杂交溶液体积等）都对杂交结果会产生影响，因此应特别注意控制好各反应条件。

(6) 洗膜 (washing membrane)。杂交完成后，为了将膜上没有和核酸结合 (杂交) 的探针去除，需要在一定的条件下对膜进行洗涤。由于非特异性杂交形成的双链的稳定性差，解链温度 (melting temperature, T_m) 低，所以在一定的温度下，一般在低于特异性杂交链 T_m 值 $5 \sim 12^\circ\text{C}$ 进行洗脱，非特异性的杂交双链解链而被洗掉，而特异性的杂交双链则保留在膜上。

(7) 检测 (detection)。根据探针标志物的不同，选择放射性自显影或化学显色等方法来显示标志探针的位置和含量，从而对待测核酸片段的大小和含量等进行分析。整个膜杂交的过程如图 7-30 所示。

(二) PCR 技术

PCR 是 polymerase chain reaction (聚合酶链反应) 的缩写，它是 1985 年由 Mullis 创立的一种体外酶促扩增特异 DNA 片段的方法。在 PCR 创立之前，DNA 的扩增非常困难，首先 DNA 需要经酶切、连接和转化等步骤构建成含有目的基因的载体，然后导入细胞中扩增，最后用同位素标志的探针筛选目的基因，操作麻烦，耗时长。PCR 技术的发明大大地简化了 DNA 的扩增过程，克服了上述扩增方法的诸多不足，短时间内就可以在体外 (细胞外) 扩增获得大量的目的基因，从而能比较容易地对目的基因进行分析和鉴定。PCR 技术因其具有操作简便、灵敏度高和特异性强等优点而被生物学的各个领域广泛采用。在这里将简要地介绍 PCR 的原理、基本操作过程和种类。

1. PCR 的原理 和天然 DNA 的复制过程类似，PCR 的 DNA 体外酶促扩增是在一对引物的诱导下，利用 DNA 聚合酶以四种 dNTP (dATP、dTTP、dCTP、dGTP) 为材料，依据模板 DNA 的特性，对模板 DNA 两引物结合位点之间的序列进行复制扩增的过程。引物是以需要被扩增区域两侧边界的 DNA 序列为依据人工合成的寡核苷酸片段，引物中每一种分别与模板 DNA 对应的一条 DNA 链互补。

PCR 的全过程是由变性 (denature)、退火 (annealing) 和延伸 (extension) 三步组成的若干个循环，每步之间通过温度的改变来实现转换。在变性过程中，模板 DNA 在 95°C 左右的高温

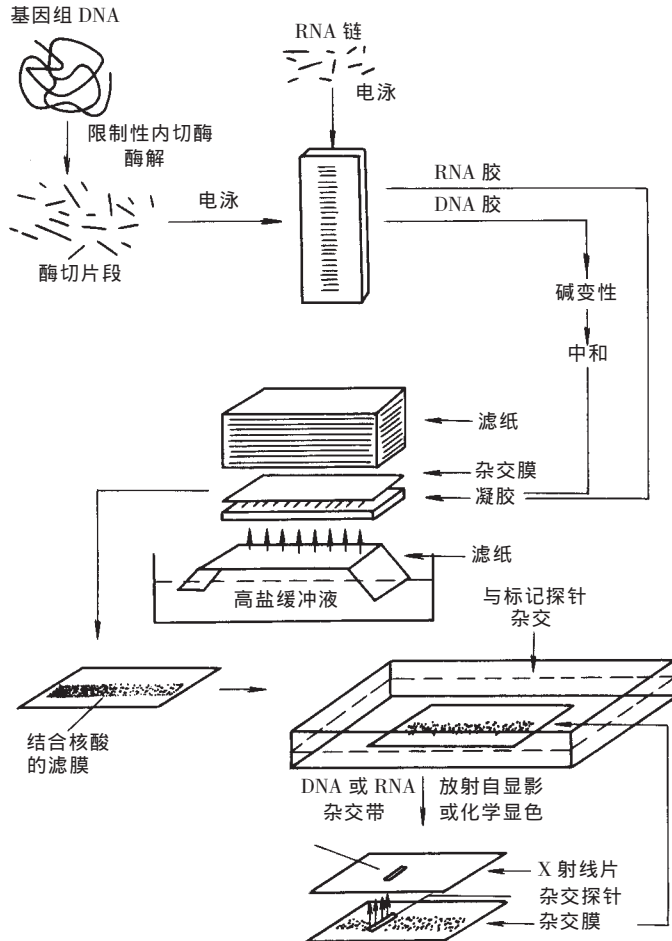


图 7-30 膜杂交过程示意图

(引自张 衡、童君坦)

下, 双链 DNA 解链成单链 DNA, 并游离于溶液中。退火是人工合成的引物在适合的温度下 (通常是 $50\sim 65^{\circ}\text{C}$) 分别与模板 DNA 需要扩增区域的两翼进行准确配对结合的过程, 通常添加的引物分子数远远大于模板 DNA 的分子数, 这样可以提高引物与模板 DNA 形成复合物的几率。引物与模板 DNA 结合后, 在适当的条件下 (温度一般为 $70\sim 75^{\circ}\text{C}$), 以四种 dNTP 为材料, 通过 DNA 聚合酶的作用, 单核苷酸从引物的 $3'$ 末端掺入沿模板合成新股 DNA 链, 这就是所谓的延伸。

每一个 PCR 循环都由变性、退火和延伸三个步骤组成, 整个 PCR 过程一般包括 30 个循环。在最初的循环阶段, 主要是由模板的 DNA 起着模板的作用, 由于每个循环的产物都可以作为下一循环的模板, 所以随着循环次数的增加, 循环产生的 DNA 产物, 即通过引物合成的新的 DNA 片段的数量急剧增加而成为主要的 DNA 模板, 因此 PCR 扩增的终产物序列是介于两个引物 $5'$ 末端的之间的区域。从理论上讲, PCR 产物的数量每循环一次都将增加一倍, 这样 30 轮循环后扩

增的 DNA 量应达到 2^{30} 个拷贝，约 10^9 个拷贝，但是在实际情况中由于受 DNA 聚合酶质量、待扩增 DNA 片段序列及反应条件等的影响，一般只能达到 $10^6 \sim 10^7$ 个拷贝。PCR 的原理见图 7-31。

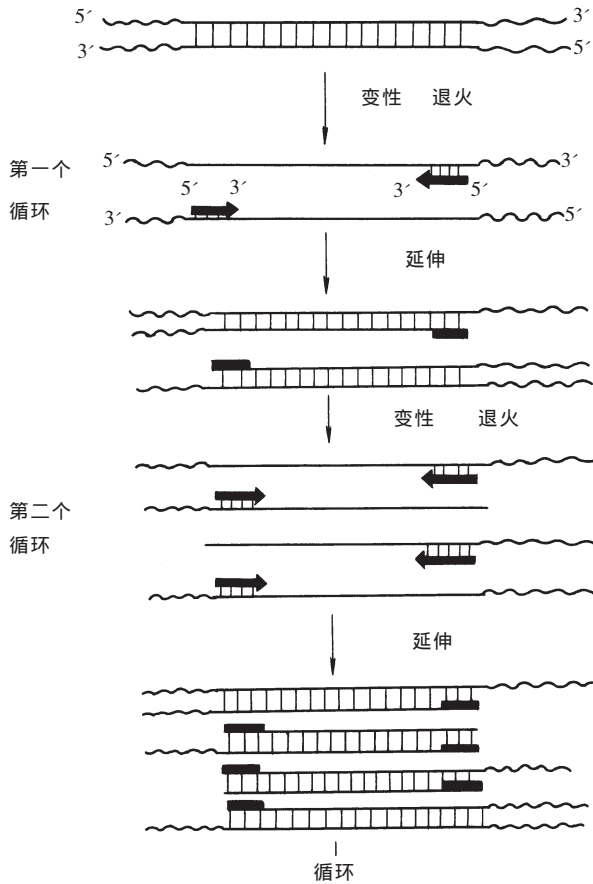


图 7-31 PCR 原理示意图

2. PCR 的基本操作过程

(1) 标准的 PCR 反应过程。

①反应体系 标准 PCR 的反应体积为 $50 \sim 100 \mu\text{L}$ ，其中含有 PCR 缓冲溶液 [50 mmol/L KCl、 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3)、 1.5 mmol/L MgCl_2 、 $100 \mu\text{g/mL}$ 明胶] 四种 dNTP 各 $20 \mu\text{mol/L}$ 、两种引物各 $0.25 \mu\text{mol/L}$ 、DNA 模板 $0.1 \mu\text{g}$ (需要根据具体情况加以调整，一般需要 $10^2 \sim 10^5$ 拷贝的 DNA) 和 2 单位的 TaqDNA 聚合酶。

②反应步骤：在 0.5 mL 的小离心管中依次加入 PCR 的反应缓冲液、四种 dNTP、引物、DNA 模板，混匀， 95°C 加热 10 min ，以除去样品中蛋白酶、氯仿等对 TaqDNA 聚合酶的影响，然后每管加入 2 个单位的 TaqDNA 聚合酶，混匀，离心 30 s ，加 $50 \mu\text{L}$ 石蜡油封盖反应体系以防止反应液挥发，将离心管置于 PCR 仪中进行 PCR 循环。

(2) PCR 的操作要点。由上述标准 PCR 的反应体系的组成可以知道，PCR 的反应体系主要

由模板 DNA、TaqDNA 聚合酶、引物以及四种 dNTP 和 PCR 缓冲液组成。由于关于 PCR 的很多内容在本书的第二章已作了较为详细的介绍，所以在这里仅就制备和选择这些材料时应注意的问题和 PCR 条件的优化等作简单的概述。

①模板 DNA 的制备：PCR 对于模板的用量和纯度要求都很低，在模板数量方面甚至 2 个拷贝的模板就可以进行 PCR；在纯度方面，细胞的粗提液可以直接进行 PCR 扩增，这些也是 PCR 的显著特点，但是大多数情况下仍需要制备一定数量的模板 DNA（通常为 $10^2 \sim 10^5$ 拷贝的 DNA）以保证扩增的效率和反应的特异性。常规制备 DNA 的方法制备的 DNA 都能满足 PCR 的要求。

②DNA 聚合酶的选择：DNA 聚合酶的选择在 PCR 中至关重要，因为它在 PCR 中起着非常重要的作用。目前 PCR 中所采用的 DNA 聚合酶都是耐热的 DNA 聚合酶，最常用的是 1987 年发现的 TaqDNA 聚合酶（Taq pol），它能经受 95°C 以上的高温而不失活，其催化聚合反应的最适温度是 $70 \sim 80^\circ\text{C}$ ，而在此温度下引物和模板结合的特异性好，因此产物的浓度高。除了 Taq pol 外，还有 Stoffek、Vent 和 Pfu 耐热 DNA 聚合酶。

③引物的设计：引物设计在 PCR 中同样占有十分重要的地位，引物的序列及其与模板的特异性结合是决定 PCR 反应结果的关键，如果引物设计不合理，PCR 的特异性和扩增效率都会降低。不同的 PCR 反应体系，由于其模板的组成、扩增片段的长度和实验目的的不同，对引物的要求也不相同，引物设计的基本原则是最大限度地提高扩增的效率和特异性，同时尽可能地抑制非特异性扩增。

④反应体系的优化：PCR 操作简便，但影响因素很多，因此需要根据不同的 DNA 模板，摸索最适的条件，以期获得最佳的反应结果。影响 PCR 的因素包括 PCR 循环参数的选择和反应体系中各成分浓度的确定。

循环参数的选择主要是指 PCR 循环中变性、退火和延伸时温度和时间的选择以及循环次数的确定。例如，变性，通常 95°C 处理 $20 \sim 30\text{s}$ 就可以使各种 DNA 分子完全变性，变性的温度过高或时间过长都可能导致 DNA 聚合酶失活而影响 PCR 的产量；但是变性的温度过低或时间过短又可能使 DNA 变性不完全，从而使模板和引物不能结合而导致 PCR 失败。同样，在退火和延伸温度与时间的选择上也应参照前人的研究经验并结合具体的模板、引物和 DNA 聚合酶等的特性进行研究确定。循环次数通常为 $25 \sim 35$ 次，此时 PCR 的产物累积量最大。随着循环次数的增加，一方面由于产物浓度过高，以至它们自身相互结合而不和引物结合，或产物链缠在一起，从而使扩增效率降低；另一方面，随着循环次数的增加，DNA 聚合酶活性下降，引物和 dNTP 浓度降低，容易产生错误掺入，导致非特异性产物增加，因此在获得足够 PCR 产物的前提下应尽可能地减少循环的次数。

PCR 反应体系中适当的 dNTP、引物、DNA 模板、DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 与添加剂等的浓度也是非常重要的。这些成分的浓度过高或过低都不利于特异性 PCR 产物的产生，在具体的研究中应在充分查阅前人研究结果的基础上，以标准 PCR 反应体系为参照，结合具体的模板和试剂通过实验确定。

(3) PCR 扩增产物的检测。PCR 扩增后结束后，根据实验目的的不同，可以采用多种方法对扩增产物进行分析，下面介绍其中较为常用的几种。

①琼脂糖凝胶电泳：根据扩增片段的大小，采用适当浓度的琼脂糖制成凝胶，取 PCR 的扩增产物 5~10 μ L 点样与凝胶中，电泳，EB 染色，紫外灯下观察，成功的 PCR 扩增可得到分子量均一的一条区带，对照标准分子量谱带对 PCR 产物谱带进行分析。

②分子杂交：将 PCR 的扩增产物按斑点或窄封印迹杂交或 Southern 印迹杂交方式和探针进行杂交，从而判断出 PCR 产物是否是预先设计的目的片段以及产物中是否存在突变等。另外，通过杂交还可以鉴定 PCR 扩增产物的大小和特异性并可进行定量分析。

③限制性内切酶分析：选择适当的限制性内切酶对 PCR 的扩增产物酶切，之后再行电泳，通过分析电泳图谱可以判断出扩增产物的特异性和是否存在突变等。

④HPLC：采用 HPLC 分析 PCR 的扩增产物，在几分钟内就可以将结果显示或（和）打印出来。另外，采用 HPLC 还可以对扩增产物进行分离制备。

(4) PCR 污染的预防。PCR 反应灵敏度很高，因此极微量的污染都可能导致假阳性。PCR 的污染源主要来自于 PCR 扩增前，提取 DNA 时所使用的反应试管和吸管中残留的（前一次）PCR 的产物、PCR 扩增后电泳点样和杂交点样时所用吸管和器皿的交叉污染、操作人员皮肤和毛发等，以及期间使用的各种试剂中和仪器设备污染的 DNA。其中提取 DNA 时所使用的反应试管和吸管中残留的（前一次）PCR 的产物是主要的污染源，这种污染又称为残留（carryover）污染。

针对上述污染源，可以采取以下措施进行预防：首先应尽可能地使用一次性的试管和吸管等，以防止残留污染的发生；其次样品 DNA 的提取等 PCR 的前处理和电泳杂交等后处理应在不同的区域进行，以防止交叉污染，在操作过程中使用一次性手套和穿戴整齐工作服（帽）可以预防操作人员皮肤和毛发的污染。

一旦出现污染可以采用紫外线照射或用 10% 的次氯酸钠溶液擦拭污染源可以消除污染。

3. PCR 的类型 PCR 技术自其诞生以来，发展迅速，应用面广。因实验材料、实验目的和实验要求等的不同，在标准 PCR 的基础上，已衍生出近 20 种不同的 PCR，这些 PCR 和标准 PCR 的原理相同，仅是在具体的操作过程中有所不同，下面简要地介绍其中的几种。

(1) 不对称 PCR (asymmetric PCR)。在标准 PCR 中两引物的浓度是相同的，如果引物的浓度不同，那么经过若干轮循环，低浓度的引物被消耗尽，以后的循环就只产生由高浓度引物引导产生的产物，结果就可以产生大量的由高浓度引物引导产生的单链的 DNA，这些单链的 DNA 可以作为探针或 DNA 测序的核酸。在这种 PCR 中由于两引物的浓度不同，所以被称为不对称 PCR。

(2) 多重 PCR (multiplex PCR)。在很多情况下，需要对 1 000 kb 大小的基因进行检测和分析，以确定基因上发生的突变或（和）缺失，如果这些突变或（和）缺失发生在基因上的多处且相距数十甚至数百个 kb，那么要对整个基因的变异进行分析，采用标准 PCR 必须分段多次扩增（因为标准 PCR 每次扩增的 DNA 片段的长度是有限的），这样既费时又费力，而且实验结果的准确性也将受到影响。如果在同一反应中采用多对引物对基因的不同片段同时进行扩增，那么就可以一次性地分析整个基因的变异情况，从而节约时间和费用，并增加实验结果的准确性。这种采用多对引物同时扩增多个 DNA 片段的 PCR 就称为多重 PCR。

(3) 巢居 PCR (nested PCR)。在巢居 PCR 中有两对引物，一对引物对应的序列在模板

DNA 的外侧，称为外引物 (outer-primer)，另一对引物对应的序列在同一模板 DNA 的外引物的内侧，称为内引物 (inter-primer)，即外引物的扩增产物中含有内引物的互补序列，外引物扩增后的产物成为内引物的模板，这样经过两次 PCR 扩增可以大大地提高检测的灵敏度，从而实现模板 DNA 含量很少 (如单拷贝的 DNA) 的样品的分析和检测。

(4) 锚定 PCR (anchored PCR)。标准 PCR 扩增 DNA 片段时，必须知道 DNA 片段两侧 DNA 的序列，这样才能合成相应的引物进行扩增。但是在有些情况下，只知道 DNA 片段一端的序列，显然标准 PCR 是不能对其进行扩增和分析的，运用锚定 PCR 则可以克服这一限制。其原理是，在基因未知末端添加已知的同聚物尾 (polytailor)，人为地赋予基因未知末端特定的序列，再合成和同聚物尾互补的 DNA 序列作为引物 (称为锚定引物)，与基因已知末端的引物一起对基因进行扩增和分析。

(5) 反向 PCR (inverse PCR)。标准 PCR 只能对两引物之间的 DNA 片段进行扩增，而不能对引物外侧的 DNA 序列扩增，反向 PCR 则可以很好地解决这一问题，从而实现了对已知 DNA 片段两侧未知片段的扩增，它是扩增未知 DNA 序列的一种简捷的方法。其原理是，首先用限制性内切酶消化 (酶解) DNA，使 DNA 片段的大小合适 [因为太短 (<200~300kb) 不能形成环状而完成接下来的环化过程，而太长则受到 PCR 本身扩增片段有效长度的限制]，消化后的 DNA 环化形成环状，然后再选择适当的内切酶，酶切已知序列的 DNA 片段，使环状 DNA 线形化，最后根据已知序列合成相应的引物就可以对未知的 DNA 片段进行扩增和分析。在上述过程中，选择合适的内切酶是非常重要的，用于消化 DNA 片段的内切酶，必须在已知的 DNA 序列上没有酶切位点，另外如果酶切后能产生黏性的末端则有利于环化的完成；而用于酶切环状 DNA 使其成线形的内切酶，则必须在已知的 DNA 序列中有唯一的酶切位点，在未知 DNA 序列中没有酶切位点。反向 PCR 的过程见图 7-32。

选择适当的内切酶还可以只对已知 DNA 序列一侧的未知 DNA 序列进行扩增，图 7-33 显示了只对已知 DNA 序列的 5' 侧或 3' 侧的未知 DNA 片段进行扩增时的酶切处理过程。它的基本过程和上述反向 PCR 的过程相同，不同之处是，消化 DNA 的内切酶除了能酶切未知 DNA 片段外，在已知序列中也有一个酶切位点，这样经消化处理后就得到了两条适当大小的 DNA 片段，它们分别环化后形成 3' 环和 5' 环，再分别选择合适的内切酶对两个 DNA 环中的已知 DNA 序列进行酶切，这样就可以实现对 5' 侧或 3' 侧的未知序列 DNA 片段的扩增。

(6) 增敏 PCR (booster PCR)。

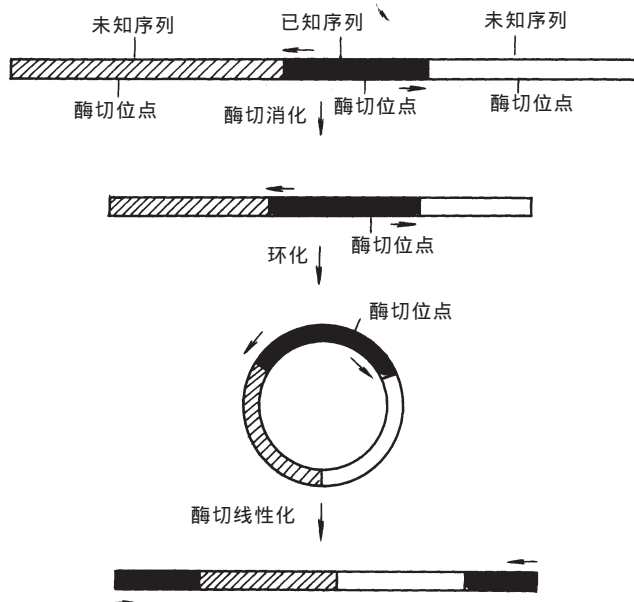


图 7-32 反向 PCR 的示意图

在标准 PCR 中，引物的浓度一般为 $0.25\mu\text{mol/L}$ ，当模板 DNA 数小于 1 000 个拷贝时，由于引物浓度的过高而容易导致引物二聚体的形成和非特异性产物竞争引物与酶，从而使 PCR 的产量明显减少。如果分两次将引物加入则可以避免上述不足。首先采用浓度仅为数十 pmol/L 的引物，适当延长退火时间，进行 20 轮左右的 PCR 扩增，然后再将引物的浓度增加至 $0.25\mu\text{mol/L}$ ，同时适当地缩短退火时间，再进行 20 轮左右的 PCR 扩增。由于第一次添加引物扩增后，模板 DNA 的浓度大大增加，所以第二次添加引物再扩增就可以大大地提高 PCR 的产量，从而提高检测的灵敏度。采用这种方法可以将样品中的数十个菌甚至一个菌检测出来。

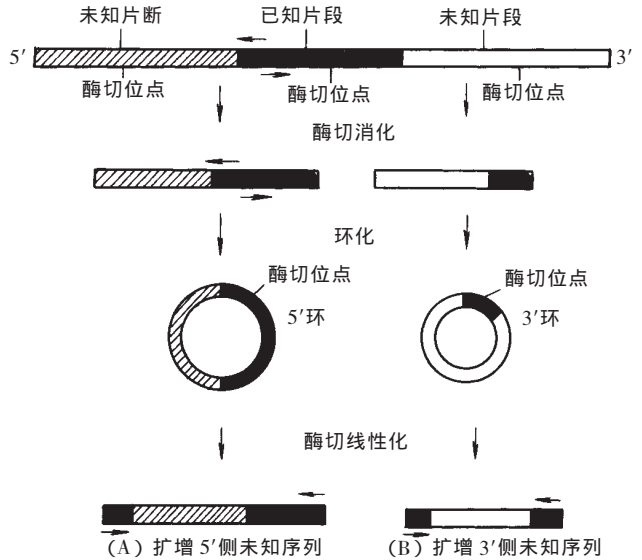


图 7-33 反向 PCR 选择性扩增已知 DNA 序列的未知 DNA 片段示意图

(7) 反转录 PCR (reverse transcript PCR)。是在反转录酶 (reverse transcriptase) 的作用下将 mRNA 反转录成 cDNA，然后采用 PCR 对 cDNA 进行扩增和分析，从而实现 mRNA 分析的方法。该方法将反转录酶和 PCR 结合在一起，是一种快速、简便、灵敏测定 mRNA 的方法，运用这种方法可以检测出单个细胞中少于 10 个拷贝的 mRNA。

的作用将 mRNA 反转录成 cDNA，然后采用 PCR

(8) 芯片 PCR (chip PCR)。是一种微流量连续式的 PCR 反应过程，在一块玻片上用三块恒温的铜片作为热源，当 PCR 反应的混合液流经不同的温度区时，自动变温，在流动中实现解链、退火和延伸。芯片 PCR 的体积小，变温迅速，当流速为 $5.8\sim 79\text{nL/s}$ 时，三温 (95°C 、 $50\sim 65^\circ\text{C}$ 、 $72\sim 77^\circ\text{C}$) 循环的温度转变速率小于 100ms ，流过 $10\mu\text{l}$ 反应液的时间为 $1.5\sim 18.8\text{min}$ ，完成 20 次循环，比一般扩增仪所需的 $2\sim 3\text{h}$ 快得多。图 7-34 是芯片 PCR 的示意图。

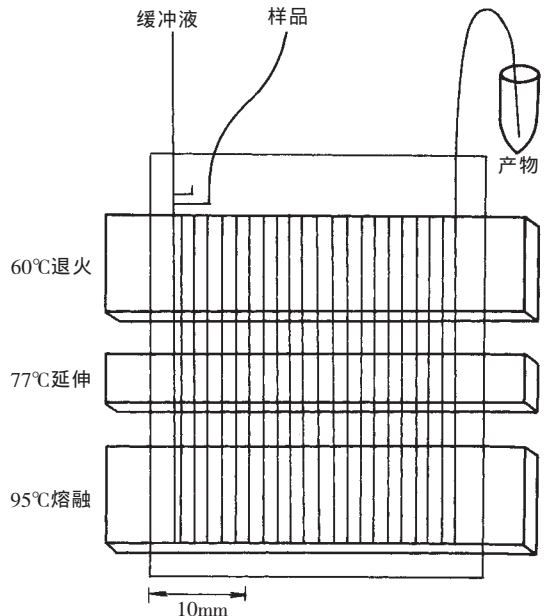


图 7-34 芯片 PCR 的示意图

这种连续流式的芯片 PCR 扩增方式通过 PCR 和芯片杂交联合起来使用，或和芯

片毛细管电泳连接，可以形成 DNA 的自动分析系统。有关芯片杂交和生物芯片等概念将在本章的第四节加以叙述。

二、分子生物学技术在食品安全检测中的应用

食品中污染的微生物种类很多，其中通过食品传播的病原菌主要有细菌和病毒，另外有些寄生虫也能通过食品传播。通常检测这些病原菌的方法是培养法，培养法的操作复杂、耗时长，有时还要进行动物实验，一般需要一周甚至更长的时间才能得到检测结果。而运用分子生物学技术则可以在较短的时间（通常为 24~48h）内获得检测结果，而且操作简便、灵敏度高。下面就分子生物学技术在检测食品污染菌（主要是病原菌）中的应用情况进行概述。

（一）样品的前处理

无论是采用分子杂交技术还是 PCR 技术来检测食品中的污染微生物，首先都必须获得一定纯度和一定数量的 DNA 作为分子杂交的材料或 PCR 的模板。由于食品的组成复杂，而且食品中除了要检测的靶微生物（目标微生物）外，往往还存在很多非靶微生物，所以从食品样品获得足够数量和纯度的靶微生物的 DNA 是一件不容易的事，在很多情况下从食品样品中获得靶 DNA 所消耗的时间、精力和费用往往比运用分子生物学技术检测它们要高得多。

食品样品的前处理主要包括靶微生物的富集浓缩和食品样品中 PCR 抑制剂的去 除等过程，另外，食品中处于亚活力状态（viable but nonculturable）或死亡的靶微生物的 DNA 对检测结果的影响也是样品处理时应注意的问题。

1. 样品的前处理过程

（1）靶微生物的富集。虽然说很多 PCR（例如增敏 PCR）能够检测出样品中很少数量甚至一个靶微生物，但是为了提高检测结果的可靠性和灵敏度，往往需要对样品中的靶微生物进行富集，常用的方法有培养增殖法、免疫吸附法和离心或过滤浓缩法等。培养增殖法采用特定的选择性培养基通过培养增殖的方式来提高样品中的靶微生物数量，通过富集培养往往还可以降低样品中 PCR 抑制剂的浓度以利于靶 DNA 的 PCR 扩增。但是，富集培养延长了样品检测时间，另外，在富集培养过程中还可能丢失一些遗传物质，特别是存在于质粒上的遗传物质，从而使得检测结果不能很好地反映样品的“原始”状态。离心或过滤浓缩方法是采用离心或过滤的方法来浓缩靶微生物，不需对样品进行富集培养，因此不会延长检测时间，也不会破坏样品的“原始性”，但是操作难度较大且一般仅适合于液体样品。免疫吸附法是分离富集靶微生物的一种很好的方法，主要是采用免疫磁珠分离技术（immunomagnetic separation technique）来分离富集靶微生物，首先将抗靶微生物的抗体包被于磁珠上，然后将磁珠与食品样品混合，通过抗原抗体的吸附作用，样品中的靶微生物吸附于磁珠上，离心分离磁珠，即获得靶微生物的富集物。免疫吸附法，在富集靶微生物的同时也去除了其他微生物，从而避免了非靶微生物可能对实验结果产生的干扰，而且在富集靶微生物的同时也去除了样品中 PCR 抑制剂对 PCR 的影响，因此本方法在富集样品中的靶微生物方面得到了非常广泛的应用。

（2）PCR 抑制剂的去 除。样品中 PCR 抑制剂的去 除也是样品前处理中非常重要的一项工作。除去 PCR 抑制剂的方法很多，上述几种靶微生物的富集方法在富集微生物的同时也能很好

地去除 PCR 抑制剂。另外，凝胶过滤也可以去除抑制剂，例如，对于土壤样品中微量的腐殖酸对 PCR 的抑制就可以采用凝胶过滤的方法来去除它。目前已有各种商品化的去除抑制剂的凝胶柱出售。

2. 样品前处理的注意问题

(1) 死亡微生物对 PCR 扩增结果的影响。富集获得了样品中不含 PCR 抑制剂的靶微生物后，采用各种 DNA 的提取方法或采用 DNA 的提取试剂盒，提取靶微生物的 DNA，然后就可以进行 PCR 扩增和分析了。但是在 PCR 扩增和分析过程中，常常出现已死亡的或处于亚活力状态的靶微生物的 DNA 对检测结果的干扰。一般地，已死亡的微生物是不会再对人类的健康造成危害的，但是有时已死亡微生物（特别是加热杀死的微生物）的 DNA 常常可以作为 PCR 的模板而得到扩增，从而影响 PCR 的扩增结果，即出现假阳性。为了消除这种假阳性，可以对样品中的靶微生物进行短时间的培养增殖，然后对增殖前后的靶微生物 DNA 进行扩增，如果样品中没有活的靶微生物，那么增菌前后 DNA 的扩增结果应该没有差别；如果有活的靶微生物存在，则培养增殖前后 DNA 的扩增结果是不同的。另一种消除假阳性的方法是，采用反转录 PCR (RT-PCR) 分析样品中靶微生物的 mRNA，由于 mRNA 半衰期很短，微生物死亡后 mRNA 迅速分解，这样采用反转录 PCR 扩增分析的 mRNA 一般都是活菌体的，因此同样可以消除假阳性。其实在有些情况下通过分析样品中死亡菌体的 DNA 可以间接地反映食品原料在加工之前是否被某种微生物污染过，从而可以推测出食品中是否可能含有由这种微生物产生的毒素。例如，通过扩增分析加热杀菌后食品样品中是否含有金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的肠毒素基因，可以间接地判断出食品中是否含有肠毒素。如果含有肠毒素基因，就可以认为食品原料在加热杀菌前已被金黄色葡萄球菌所污染，因此食品中可能含有肠毒素；如果没有肠毒素基因则可以认为食品中不存在肠毒素。

(2) 亚活力状态微生物对 PCR 检测结果的影响。用 PCR 等分子生物学技术分析食品中的污染微生物时，样品中处于亚活力状态的菌体数量也是一个值得注意的问题。一般地，处于亚活力状态的菌体不能形成菌落，用常规的微生物分离培养方法不能检测到它们，但是处于这种状态的微生物，特别是病原微生物，例如沙门氏菌 (*Salmonella* spp.) 对人体同样有危害。所以在用培养法检测它们时，一般首先要用恢复培养基对它们进行恢复性培养，然后再进行富集分离。以分子生物学技术分析检测处于这种亚活力状态的微生物时，有时很好地将它们检测出来，有时则检测不出来，这主要取决于是什么因素使它们处于亚活力状态，以单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 和产肠毒素的大肠杆菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli*) 为例，如果它们处于亚活力状态是由酸或 H_2O_2 导致的，那么用 PCR 等分子生物技术是检测不出它们的，如果是由于热处理 (包括 $100^\circ C$ 煮沸或 $121^\circ C$ 灭菌处理) 或细胞处于饥饿状态而导致它们处于亚活力状态的话，那么用 PCR 就能将它们检测出来。所以当以分子生物技术检测处于亚活力状态的微生物时，应该首先弄清楚是什么因素使它们处于这种状态的，然后再采用相应的分析方法，分析检测它们。

(二) 食品中污染微生物的分子生物学技术检测

食品中污染的微生物的种类很多，常见的污染菌，特别是常见的食品中污染病原菌几乎都可以用分子生物学技术来分析和检测它们，表 7-3 列出了食品中常见的污染病原菌的种类、主要的致病因子、相关的检测基因和分子生物学检测方法。

表 7-3 分子生物学技术在检测食品中污染病原微生物和寄生虫中的应用

名 称	主要致病因子	相关的检测基因	分子生物学检测方法
细菌			
亲水气单胞菌 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	气单胞菌细胞溶素 (aerolysin) 溶血素 (hemolysins)	<i>aer</i> 基因 β -溶血素基因	PCR
蜡样芽孢杆菌 (<i>Bacillus cereus</i>)	肠毒素 (enterotoxin)	<i>bce</i> 基因	PCR
弯曲杆菌 (<i>Campylobacter</i> spp.)	菌体	<i>flaA</i> 和 <i>flaB</i> 基因	PCR, 分子杂交
肉毒梭菌 (<i>Clostridium botulinum</i>)	神经毒素 (neurotoxin)	神经毒素基因	PCR, 分子杂交
产气荚膜梭菌 (<i>Clostridium perfringens</i>)	肠毒素	肠毒素基因	PCR, 分子杂交
肠道致病性大肠杆菌 (enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>)	菌体	存在于黏附因子 质粒上的基因	PCR, 分子杂交
肠道侵袭性大肠杆菌 (enteroinvasive <i>E. coli</i>)	菌体	存在于质粒上 的侵袭基因	PCR, 分子杂交
产肠毒素的大肠杆菌 (enterotoxin genic <i>E. coli</i>)	耐热肠毒素	存在于质粒上 的 <i>elt</i> 基因	PCR, 分子杂交
出血性大肠杆菌 (enterohemorrhagic <i>E. coli</i>)	菌体	<i>slt</i> 、 <i>eaeA</i> 、 <i>hlyA</i> 和 <i>hlyC</i> 等基因	PCR, 分子杂交
单核细胞增生李斯特氏菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	溶血素 李斯特细胞素	溶血素基因 和 <i>msp</i> 等基因	PCR, 分子杂交
沙门氏菌 (<i>Salmonella</i> spp.)	菌体	<i>invA</i> 、 <i>spvA</i> 、 <i>oriC</i> <i>agfA</i> 和 <i>himA</i> 等基因	PCR, 分子杂交
志贺氏菌 (<i>Shigella</i> spp.)	菌体和毒素	毒素基因和 <i>ial</i> 与 <i>ipaH</i> 等基因	PCR, 分子杂交
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	肠毒素	肠毒素基因	PCR
霍乱弧菌 (<i>Vibrio cholerae</i>)	肠毒素	<i>extA</i> 和 <i>etxB</i> 等基因	PCR, 分子杂交
小肠结肠炎耶尔森氏菌 (<i>Yersinia enterocolitica</i>)	毒素和菌体	<i>inv</i> 、 <i>ail</i> 和 <i>yst</i> 等基因	PCR
病毒			
Norwalk 病毒	病毒粒子	特异性 DNA 片段	PCR
轮状病毒 (rotavirus)	病毒离子	特异性 DNA 片段	PCR 和分子杂交
肝炎病毒 (hepatitis virus A)	病毒粒子	特异性 DNA 片段	PCR
肠病毒 (enterovirus)	病毒离子	特异性 DNA 片段	PCR
寄生虫			
隐孢球虫 (<i>Cryptosporidium</i>)	虫体	特异性 DNA 片段	PCR
内阿米巴虫 (<i>Entamoeba</i>)	虫体	特异性 DNA 片段	PCR 和分子杂交
梨形鞭毛虫 (<i>Giardia</i>)	虫体	特异性 DNA 片段	PCR 和分子杂交

第四节 生物芯片及其在食品安全检测中的应用

一、生物芯片的定义及分类

(一) 定义

生物芯片 (biological chip) 的概念是 20 世纪 80 年代中期提出的。随着“人类基因组计划”(Human Genome Project) 的进展, 生物芯片技术得到了迅速的发展, 成为 20 世纪 90 年代中期以来影响最深远的重大科技进展之一, 它是融微电子学、生物学、物理学、化学、计算机科学为一体的高度交叉的新技术, 具有重大的基础研究价值和广阔的产业化前景。生物芯片技术虽然诞生的时间很短, 但是它已经在 DNA 测序、DNA 突变体检测、疾病诊断、药物筛选、毒理基因组学、农作物优育优选、环境检测和防治、军事医学、食品卫生监督和司法鉴定等方面已表现出了很好的应用前景。由于生物芯片技术出现的时间不长, 且发展迅速, 所以有关生物芯片的定义和概念也在不断的变化中。到目前为止, 关于生物芯片的定义至少有三种表述方式, 第一种是认为 DNA 芯片或基因芯片 (DNA or gene chip) 就是生物芯片, 这主要是因为 DNA 芯片出现最早, 研究最多, 应用最成功; 第二种认为生物芯片主要包括 DNA 芯片和蛋白质芯片 (protein chip), 因为到目前为止这两种芯片最为成功; 第三种是将微流路生物分析系统 (microfluid biological analysis system) 也归入了生物芯片的范畴。有关这些概念的具体内容将在以下叙述中进一步阐述。

笔者认为就目前的研究情况看, 第二种定义方法似乎更贴切一些, 所以笔者将生物芯片的概念定义为, 生物芯片是按预先的设置排列固定有大量生物识别分子 (例如 DNA 片段、RNA 片段、抗原抗体分子或蛋白质或肽分子) 的面积很小 (通常只有一到几平方厘米) 的硅片、载玻片或高分子聚合物薄片。其工作原理是将待检测样品加在芯片的表面, 由于生物分子特异性亲和反应 (如核酸杂交反应、抗原抗体反应等), 检测样品中的待检测成分分别和芯片上固定化的生物识别分子结合反应, 从而实现样品的分析和检测。生物芯片可以在很小的面积上并行分析成千上万种生物分子, 分析结果的可比性好, 试剂的消耗量少, 并可实现微型化和自动化。

(二) 分类

生物芯片的分类方法很多, 目前常用的是根据芯片上固定的生物识别分子 (探针) 的种类或芯片的用途进行分类。

根据芯片上固定的探针不同, 生物芯片可分为 DNA 芯片 (DNA chip) 和蛋白质 (肽) 芯片 (protein or peptide chip) 等。其中 DNA 芯片研究得最早、最多和最清楚。所谓 DNA 芯片又称为 DNA 微阵列 (DNA microarray), 是按特定的排列方式排列固定有大量基因片段 (可以是相同的基因片段, 也可以是不同的) 的硅片、玻璃片或塑料片。它的工作原理是将样品加在芯片上, 通过分子杂交方式对样品进行分析, 从而大规模高效地获取相关的生物信息。从本质上讲, DNA 芯片的工作原理与 Southern 印迹杂交的相同, 只是 DNA 芯片是将大量的基因片段同时密集固定在同一块很小的硅片、玻片或塑料片上, 然后在相同的实验条件下, 同时完成多种不同分子的杂

交和检测,因而与传统杂交法相比具有操作简单、节约时间和试剂、自动化程度高、检测的靶分子种类多、成本低、效率高和检测结果的可靠性强等优点。蛋白质芯片,又称为蛋白质微阵列(protein microarray)是将大量的蛋白质分子(例如抗体或抗原分子)或肽链有序排列固定在载体薄片上形成的。利用蛋白质或肽能特异性地与配体分子(如抗原或抗体)结合的原理,芯片上的蛋白质分子或肽链与样品中的相关成分发生反应,然后加入标记分子,并用阅读仪分析和存储结果,这就是蛋白质芯片的工作原理。除了DNA芯片和蛋白质芯片外,其他有可能开发成功的芯片还有药物受体芯片(medicine acceptor chip)、激素芯片(hormone chip)、多糖芯片(polysaccharide chip)、细胞芯片(cell chip)、组织芯片(tissue chip)等。

根据芯片的用途,生物芯片可以分为样品制备芯片(chips for sample preparation)、生化反应芯片(chips for biochemical reaction)、检测芯片(detection chips)、芯片实验室(Lab-on-chip)等。

样品制备芯片是用于制备样品的芯片,它可以将通常在实验室需要多个操作步骤才能完成的工作集中于一个芯片上完成。以DNA分析为例,DNA的制备需要经过细胞分离、破碎和脱蛋白等许多步骤才能得到纯度足够高的DNA样品,在DNA样品制备芯片中细胞的分离目前主要采用过滤分离和介电泳分离(利用在芯片上所施加的高频非均匀电场使不同的细胞内诱导出偶电极,导致细胞受不同的介电力作用,把细胞从样品中分离出来)等来完成。细胞的破碎方法有芯片升温破胞、变压脉冲破胞和化学破胞等。对DNA的纯化捕获,Cepheid公司采用特定的工艺在硅片上加工出含有5 000个高200 μm 直径20 μm 的具有细柱式结构的DNA提取芯片,专门用于DNA的提取和纯化。

生化反应芯片是用于进行生物化学反应的芯片。与传统生化反应过程相比,生物芯片可以高效、快速、经济地完成生物化学反应。目前研究得比较多的生化反应芯片是PCR芯片。在芯片上进行PCR,可以节约实验试剂,提高反应速度,并可以同时完成多个片段的扩增反应,图7-34就是PCR芯片中的一种。

检测芯片,顾名思义是用来检测生物样品的芯片。前面叙述的DNA芯片和蛋白质(肽)芯片都属于检测芯片。

芯片实验室,就是将各种功能的芯片集约在同一载体片(通常为硅片)上,形成的(复合)多功能芯片。芯片实验室技术有望将实验室进行的样品制备、生化反应和检测等过程部分或全部地集约“浓缩”在一起,这也是生物芯片技术发展的最终目标。

1998年Nanogen公司的程京博士和他的同事们首次报道了采用芯片装置完成了从样品制备到反应结果显示的全过程。他们用这个装置从混有大肠杆菌的血液中成功地分离出了细菌,在高压脉冲破胞之后用蛋白酶K催化脱蛋白,制得纯化的DNA,然后用另一块电子增强的DNA杂交芯片分析证实提取物是大肠杆菌的DNA。在这里他们将DNA样品制备芯片和DNA检测芯片联合在一起。随后各种芯片实验室(复合芯片)相继出现,有将样品的制备和PCR扩增反应集约在同一芯片上的芯片实验室,也有将PCR扩增和凝胶电泳分离结合在一起的芯片实验室,还有将样品制备、PCR扩增和DNA检测等全过程整合在同一载体上的芯片实验室。从某种程度上讲,前面所述的DNA样品制备芯片也是一种芯片实验室,因为在DNA样品制备芯片上包括了细胞的分离破碎、去蛋白和DNA捕集等过程。

在芯片实验室中，各芯片之间是在计算机的控制下通过微流路 (microfluid)、微泵和微阀等来实现有序联系的。微流路是采用一种所谓的光刻平板印刷技术 (optical sculpturing plate printing technique, 有关其具体内容将在随后叙述), 在各芯片之间刻蚀出凹槽以实现相互联系。微流路技术和 DNA 芯片几乎是同时出现的, 它的出现使得生物分析仪及生物分析过程的微型化、微量化和集约化成为可能, 从而出现了一种所谓的微流路生物分析系统 (microfluid biological analysis system)。由于微流路技术和生物芯片技术之间有密切的联系, 加之生物芯片和微流路分析系统都是为了实现分析过程的微量化和集约化, 从而节约时间、经费和人力等, 因此最近有人认为微流路生物分析系统也应该归入生物芯片的范畴, 称为微流路生物芯片 (microfluid biological chip)。这类微流路生物芯片自 20 世纪 90 年代起发展非常迅速, 国外的 PE 公司、Affymetrix 公司、Motorola 公司和 Nanogen 公司等都在竞相研究和开发。这种芯片由于能将制药、化工、生化分析、实验室化学等复杂的过程微型化并集成在一起, 因此具有很强大的功能, 不仅使用携带方便, 而且工作效率大大提高, 运行成本明显降低。

图 7-35 是将 PCR 扩增和电泳分析结合在一起的 DNA 微流路芯片, 其工作原理是, 首先将 DNA 提取液和扩增 DNA 所需的其他试剂分别于不同的加样区的两个液体入口加入, 在毛细管的作用下, 两种液体分别进入流体通道, 直达通道的疏水区, 在气阀的控制下, 气体将气阀左边流体通道中的液体排除, 将气阀右边和疏水区之间的液体 (大约 120nL) 推入热循环进行 PCR 扩增, 扩增结束后, 在气体的作用下, 液滴进入电泳区进行电泳分离和分析。图 7-36 是另一种微流路免疫分析仪 (芯片) 的示意图, 以免疫竞争法分析血清中的茶叶碱为例, 对其工作原理说明如下。图中 1 号和 2 号为缓冲液池, 3 号和 4 号为废液池, 5 号、6 号和 7 号为样品和试剂池, J_1 、 J_2 、 J_3 、 J_4 、 J_5 为连接点或拐点。首先在 1 和 2 号池中装满缓冲液, 在毛细管的作用下, 缓冲液灌满整个通道, 然后在 5 号、6 号和 7 号池分别装入稀释的血清样品、荧光标志的茶叶碱和抗

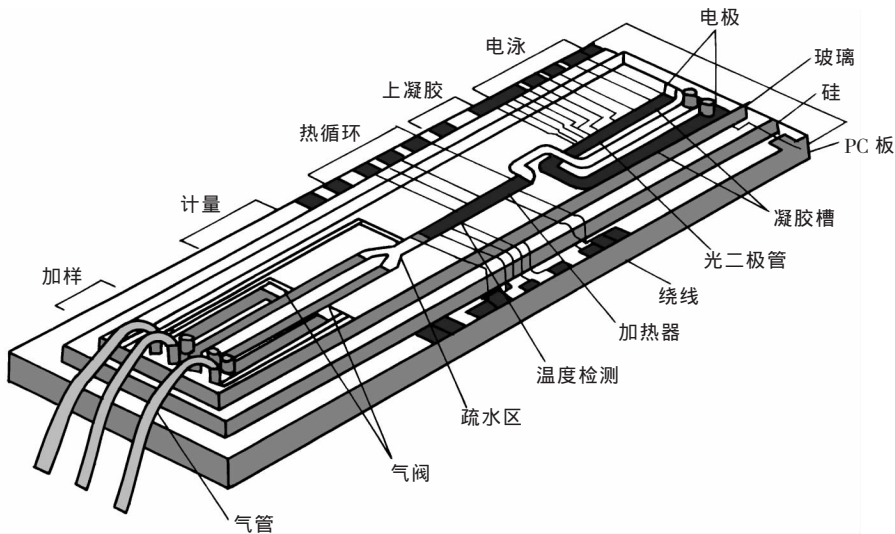


图 7-35 DNA 微流路芯片
(引自 Cheng, J. 等)

茶叶碱抗体，分析时将5号、6号和7号池接地，3号池为负高压 $-3\sim-6\text{kV}$ ，这样在电渗的作用下样品进入分析通道，在 J_1 至 J_3 之间抗原（茶叶碱）和标志抗原混合，然后再和来自7号池的抗体在 J_3 处混合，从 J_3 至 J_4 之间抗原和标志抗原与抗体进行竞争反应，反应液通过 J_5 进入3号废液池，当反应液开始进入3号池时，切断3号池和5号、6号、7号之间的电路，同时将1号池接地，4号池为负高压（ -6kV ），这样 J_4 和 J_5 之间的反应液（约 100pL ），进入分离和分析检测区，实现样品的分析，最后废液进入4号池。采用上述分析芯片，对血清中的茶叶碱进行检测，检测极限可达 0.26mg/L ，回收率为 $(107\pm 8)\%$ 。

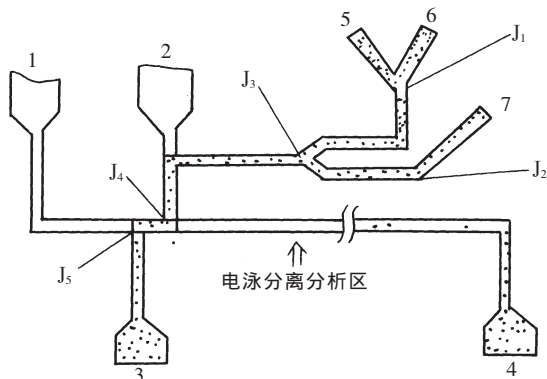


图 7-36 微流路免疫芯片示意图
(引自马立人、蒋中华)

二、生物芯片的制备方法

如前所述，生物芯片主要包括 DNA 芯片和蛋白质芯片，其中 DNA 芯片研究得最多，因此制备生物芯片的方法也主要是为 DNA 芯片的制备而设计的。在这里将主要介绍 DNA 芯片的制备方法，然后简要地介绍蛋白质芯片的制备和微流路的刻蚀。

(一) DNA 芯片的制备方法

1. 载体及其活化 载体是用于连接、吸附或包埋各种生物大分子，使其以水不溶状态行使其功能的固相材料的统称。载体可以是颗粒状的（如葡聚糖凝胶颗粒和琼脂糖凝胶颗粒），也可以是薄膜或薄片状的（如玻璃片和金属片等），用于生物芯片制备的载体都是薄片或薄膜状的。作为生物芯片的载体材料至少应满足以下要求，第一是载体表面必须有足够多的活性基团，以便与生物分子进行偶联；第二是载体应有相当的情性和足够的稳定性，所谓情性是指载体的其他性能或特异性吸附不应该干扰生物大分子的功能，而稳定性（包括机械的、物理的和化学的稳定性）是指载体遭受一定的压力或酸碱条件后不会发生变化；第三是载体应具有很好的生物兼容性。目前用作生物芯片的载体材料主要有玻璃片、金属片、硅片和各种有机高分子制作的薄膜或薄片。其中玻璃片是最常用的载体材料，原因可能是其来源方便；表面有足够多的羟基，便于在适当处理后或直接和生物大分子偶联；透光性好，适合于发光检测；采用光刻蚀方法可以在其表面刻出微流路。

载体的活化是指采用不同的活化试剂通过化学反应在载体表面键合上各种各样的活性基团，以便和生物大分子共价结合。载体的活化方法很多，本书第四章酶固定化部分已讲述了一些，这里不再重复。

2. DNA 芯片的制备方法 DNA 芯片的制备方法包括点样法和原位合成法两大类。所谓点样法是将合成好的 DNA 和 cDNA 等片段通过点样的方式直接点接于载体上；而原位合成法是以单

核苷酸为原料在载体表面直接合成 DNA 片段（寡核苷酸片段）。

根据点样方式的不同，点样法又可以分为打印点样和喷印点样两种，在打印点样中点样针头与芯片直接接触，而喷印的点样针头与芯片保持一定距离，如图 7-37 所示。这两种点样方法各有优缺点，打印法的优点是探针密度高，通常 1cm^2 可打印点样 2 500 个点，缺点是定量准确性及重现性不好，打印法易堵塞且使用寿命有限；喷印法的优点是定量准确，重现性好，使用寿命长，缺点是喷印的斑点大，因此点样密度较低，通常 1cm^2 只能点 400 个点。

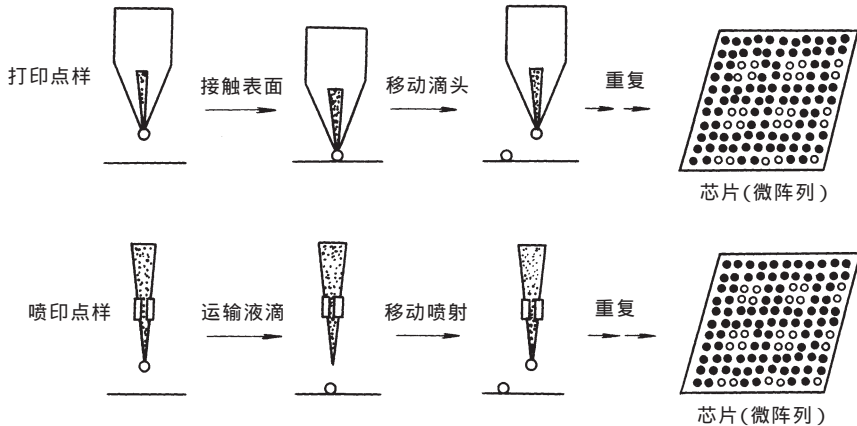


图 7-37 打印点样和喷印点样示意图
(引自 Pease A.C. 等)

原位合成法主要包括原位喷印合成法和原位光解保护基合成法两种。原位喷印合成的原理与喷墨打印类似，不过喷印头和墨盒有多个，墨盒中装的是四种碱基等液体而不是墨水，喷印头可在整个芯片上移动，并根据芯片上不同位点 DNA 片段的序列需要，将特定的碱基喷印在芯片特定的位置进行合成，该技术采用的合成原理与传统的 DNA 固相合成一致，因此无特殊制备的化学试剂。原位光解保护基合成法的原理是，首先活化载体上的基团（如羟基）并偶联上光保护基团，然后在载体表面覆盖上一层具有半透明区和不透明区间隔的掩蔽膜，将光束通过掩蔽膜照射载体，光线通过半透明区照射到载体上使被照射部位光解保护基团光解脱落，被保护基团激活（而不透明区的光解保护基团不脱落，被保护基团不激活），被激活的基团和带有光解保护基团的单核苷酸反应结合。重复上述过程逐步增加核苷酸的数量就可以合成适当长度的特异性的寡核苷酸片断，图 7-38 是原位光解保护基合成法示意图。目前通过原位光解保护基合成法可以在 1cm^2 的载体表面上合成约 40 万个寡核苷酸片断。

(二) 蛋白质（肽）芯片的制备方法

蛋白质芯片的制备方法和 DNA 芯片的制备方法一样，也分为点样法和原位合成法两类。点样法是将合成并提取纯化的蛋白质或肽直接点接在活化载体的表面，使其与载体的活化基团结合而固定在载体上。原位合成法主要用于肽芯片的制备，和 DNA 原位光解保护基合成法一样，先将载体表面的活性基团以光解保护基团保护起来，然后光线通过掩蔽膜照射到载体表面，使光解保护基团选择性脱落，被保护基团激活，之后再带有保护基团的氨基酸结合上去。重复上述过

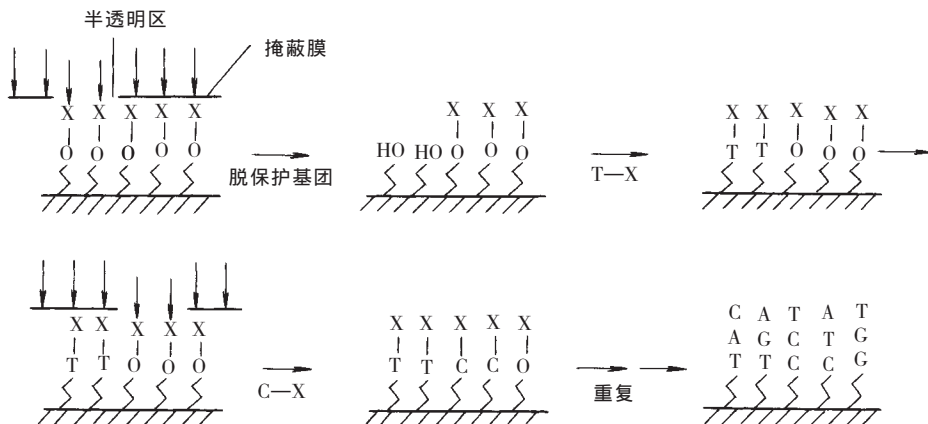


图 7-38 原位光解保护基合成法示意图

X. 光解保护基团 A. 腺嘌呤 G. 鸟嘌呤 C. 胞嘧啶 T. 胸腺嘧啶

(引自 Stephen P.A. 等)

程就可以得到结合（固定）有一定长度肽链的肽链芯片。

表 7-4 点样法和原位合成法制备的 DNA 芯片的优缺点比较

比较项目	原位合成法	点样法
芯片密度	高密度	中等密度
核酸长度	一般小于 25 个核苷酸	可以高达 500~5 000 个核苷酸
主要制作成本	掩蔽体的制备	点样仪的投资
局限性	主要用于 DNA 和肽芯片制备	除用于 DNA 和肽芯片制备外，还可以用于抗原抗体和药物受体等芯片的制备
结果分析	比较容易有序测读，但是对仪器的分辨率要求较高，字读，易出现漏读和错读	测读分析软件较复杂，易做对比分析，句读，错读较少
最佳适用范围	再测序，突变点的查明	比较分析

注：资料引自马立人、蒋中华。

（三）微流路刻蚀技术

微流路刻蚀技术（microfluid etching technique）在生物分析仪器和生物分析过程的微型（量）化和集成化中起着非常重要的作用，芯片实验室也必须通过微流路将各部分联系起来才能实现样品制备、生化反应和分析检测的连续化和集成化。

微流路刻蚀通常是在硅片上采用光刻平板印刷技术（optical sculpturing plate printing technique）进行的。光刻平板印刷技术包括光敏胶涂渍、光刻和刻蚀（或增厚）三个基本的过程。所谓光敏胶涂渍是将光敏感聚合物均匀涂在硅片上，蒸干溶剂，形成光敏层。然后在光敏层上覆盖掩蔽膜（和 DNA 芯片制备中的掩蔽膜一样，掩蔽膜上以半透明区和不透明区间隔绘制了预先设计的图案），以光照射掩蔽膜，光线通过掩蔽膜的半透明区照射到光敏层上使被照部位曝光，不透明区覆盖的光敏层由于不被光线照射而不曝光，将曝光部分的光敏层去除，这样就将掩蔽膜上的图案“光印”到了光敏层上，这个过程称为光刻。随后以化学试剂（常用的有氢氧化钾溶液

和硝酸与氟氢酸的混合溶液) 腐蚀或等离子体等轰击去除了光敏层处的硅片, 形成凹槽, 这就是所谓的刻蚀。其中以化学溶剂进行的刻蚀, 由于是在溶液中进行的, 所以被称为湿性刻蚀; 而等离子体刻蚀是在无溶液状态下进行的, 所以被称为干性刻蚀。也可以在光刻完成之后通过加热、电镀和喷涂等方式, 将二氧化硅或其他金属材料沉积在去除了光敏胶层的硅片上, 形成凸形增厚层。最后去除硅片上剩余的光敏层, 这样就在硅片上按预先设计的图案刻出了微流路。对于一些高度集成的微型化器件, 常常要在同一块硅片上进行高达 25 次甚至更多次数的光刻平板印刷, 才能完成整个微流路的刻蚀。图 7-39 是微流路刻蚀过程示意图。

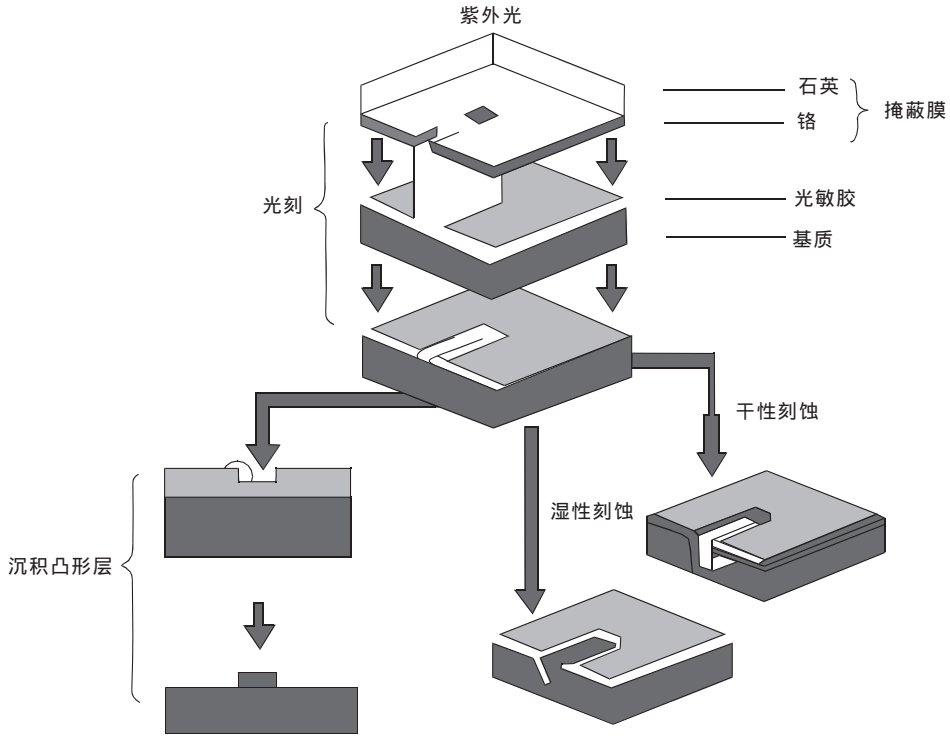


图 7-39 微流路刻蚀过程示意图
(引自 Gregory T.A. 等)

三、生物芯片的应用

虽然生物芯片诞生的时间不长, 但是其在生物学研究的很多方面都得到了应用, 并表现出了非常广阔的应用前景, 其实正是由于其良好的应用前景才使得生物芯片的研究和应用发展迅速。下面就 DNA 芯片和蛋白质芯片的应用情况进行简要的概述, 并将对生物芯片技术在食品安全检测中的应用前景进行展望。

(一) DNA 芯片的应用

DNA 芯片是迄今为止研究最多, 应用最为成功的一种生物芯片。到目前为止, 至少在以下

几个方面得到了应用。

1. DNA 序列测定 人类基因组计划及其相关努力的目的是为了鉴别和测定人类基因的序列,弄清楚基因信息的生物相关性、特定基因和基因组其他区域的功能,以及它们在人类疾病发生和发展中的作用。基因组的测序是完成上述目的的第一步,而传统的两种测序方法(Sanger 和 Maxam-Gilbert),在效率、费用和可靠性等方面都不能满足人类基因组测序的需要,因此很多高效快速测序方法相继诞生,杂交测序(sequencing by hybridization, SBH)和邻堆杂交(contiguous stacking hybridization, CSB)就是其中的两种。

SBH是最初发展起来的 DNA 芯片技术,其过程为,首先将未知序列的单链 DNA 片段和 DNA 芯片进行杂交,互补序列形成双链,然后通过分析鉴定双链体的情况就可以得出未知 DNA 的序列。例如,用含65 536个寡核苷酸片段,每个片段含8个核苷酸的 DNA 芯片,采用 SBH 技术,可测定 200bp 长 DNA 序列;采用67 108 864个寡核苷酸片段,每个片段含13个核苷酸的 DNA 芯片,可测出数千个碱基长度的 DNA 片段的序列。在 SBH 技术中,其效率随着芯片中寡核苷酸数量及其长度的增加而提高,但芯片中寡核苷酸数量与长度的增加,会提高 DNA 芯片的复杂性,同时降低杂交的准确性。采用 CSH 技术可以弥补 SBH 技术存在的弊端,CSH 技术的应用增加了芯片中寡核苷酸的有效长度,加强了序列测定结果的准确性,可进行较长 DNA 片段的测序。计算机模拟论证表明8个核苷酸长度与5个核苷酸长度邻堆杂交,相当于13个核苷酸长度的芯片的作用,可测定数千个核苷酸长的 DNA 序列。

SBH 和 CSH 等快速测序技术的应用和发展大大地加速了人类基因组计划的测序工作。但是以 SBH 和 CSH 测序时至少还存在以下一些问题:①芯片中各 DNA 片段的组成不同,它们最佳的杂交条件也不同,很难找到适合芯片中每一对杂合子的最佳条件,因此容易出现假阳性和假阴性的杂交结果;②SBH 不适合于含有许多内部重复和简单序列单元的 DNA 的测序,只适合于生物体(如细菌、酵母和病毒)的简单基因组的直接测序,或高等生物体基因组中特定区域的测序;③其技术本身还需要进行改进,以提高分辨率和区分完整与错配双链体的方法,相应的测试设备和软件也还有待于开发。尽管 SBH 还存在上述诸多不足,但是用 SBH 来核实用经典的基于凝胶方法得到的序列数据(即所谓的再测序)特别有用,因为 SBH 基于不同的原理,它可以检测出经典测序方法的错误,从而消除混入数据库中的一些错误的序列。

2. DNA 突变检测 生物体在外界环境的作用下,有些基因会因为损伤而发生变异,出现各种各样的基因突变。在基因突变中通常只有极少数是对生物个体有利的,绝大多数突变对生物体是无意义或有害的,这些有害的基因突变可能导致各种遗传疾病、肿瘤或其他疾病,因此检测基因突变是对遗传疾病和肿瘤等进行诊断的重要手段,对于疾病的早期发现和防治具有重要的意义。

基因突变的检测方法很多,主要包括 DNA 分子杂交(DNA molecular hybridization)、PCR (polymerase chain reaction)、毛细管电泳(capillary electrophoresis)和 DNA 测序(DNA sequencing)等,其中 DNA 测序是检测基因突变类型和突变位点的简单快速的方法。如前所述,DNA 芯片和杂交测序相结合是一种高效快速的测序方法,因此 DNA 芯片在基因突变体的检测中也发挥着非常重要的作用。例如,对人 BRCA 1 基因外显子 11、CFTR 基因、 β -地中海贫血、酵母突变菌株间、HIV-1 逆转录酶及蛋白酶基因等的突变检测中都采用了 DNA 芯片。

3. DNA 多态性的分析 所谓 DNA 多态性 (DNA polymorphism) 是指生物群体中, 个体间基因核酸序列的差异。DNA 的多态性可以影响限制性内切酶的切割位点, 从而导致 DNA 限制性片断长度的多态性 (DNA restriction fragment length polymorphism)。DNA 多态性的分析可以为生物分类、基因突变检测和某些遗传性疾病诊断等方面提供重要的信息。

用于 DNA 多态性分析最有效和应用最广泛的方法是采用等位基因特异性的寡核苷酸探针进行示差杂交, 但是这种方法存在着费时费力以及需要预先了解目标等位基因 DNA 多态性方面的知识等诸多缺点, 因此限制了其作为常规的 DNA 多态性检测技术。最近, 一种以 DNA 芯片为基础的简单快速的用于 DNA 多态性分析的直接荧光检测方法 (direct allele-specific fluorescence targeting) 被开发出来, 其基本的分析过程如下: 首先将等位基因特异性的寡核苷酸探针固定在玻璃片上形成 DNA 芯片, 然后采用 PCR 技术扩增待检测的基因组的 DNA, 得到荧光标志的单链 DNA 片断, 将其与 DNA 芯片杂交, 最后通过荧光扫描检测技术分析杂交模式来鉴定 DNA 的多态性。采用该技术对人的酪氨酸酶基因 4 个外显子中的 5 个单核苷酸突变进行了分析, 结果表明单核苷酸错配和完全匹配的杂交模式非常容易区别。其他相关的研究也表明该方法是有效的。

4. 基因表达分析 随着各种基因组测序工作的开展和进展, 基因表达分析显得愈来愈重要。目前已知序列的基因中, 有相当多基因的生物功能有待查明, 例如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 基因组的测序工作已经完成, 共有大约 6 000 个基因, 但是其中约有一半基因的生物功能还不清楚。另外, 识别细胞系谱或组织间基因表达的差异也是现代生物学研究的重要内容之一。因此, 对基因表达的分析研究成为人们非常关注的研究课题之一, 而建立一种灵敏度高、准确性好、快速高效的分析检测技术来对基因表达进行分析也是非常迫切和必要的。在众多的基因表达分析方法中, DNA 芯片结合 PCR 扩增, 通过标志探针和分子杂交反应是定量分析基因表达的一种很好的方法。采用该技术已比较成功地对多种生物包括拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、酿酒酵母以及人类等的基因组表达情况进行了研究, 并且用该技术一次性检测了酵母几种不同菌株间数千个基因表达谱的差异。

5. DNA 芯片在其他方面的应用 DNA 芯片除了应用于上述几个方面外, 在克隆子选择及文库筛选、微生物菌种鉴定及致病机理研究、药物筛选及毒理学研究以及农业、林业、军事和食品安全检测等很多方面都有广阔的应用前景。

(二) 蛋白质芯片的应用

虽然蛋白质芯片在研究和应用方面都不如 DNA 芯片, 但是随着人类基因组计划的完成和后基因组 (postgenome) 计划与蛋白质组 (proteome) 计划的提出, 蛋白质芯片的研究和应用都将得到很大的加强。下面对蛋白质芯片的应用情况进行简要介绍。

2000 年 9 月, MacBeath 和 Schreiber 在美国的《科学》杂志上报道了利用蛋白质芯片来研究蛋白质之间以及蛋白质与小分子之间的相互作用。在研究中首先在用于制备芯片的各种蛋白质溶液中加入甘油, 以防止蛋白变性, 然后将蛋白质溶液直接点接于载体膜上并固定化, 之后以牛血清白蛋白进行封闭, 降低膜上的背景, 即得蛋白质芯片。MacBeath 和 Schreiber 利用这些简单的手段制成了每平方厘米有 1 600 个点的蛋白质芯片。将荧光标记蛋白或 ATP 标记的激酶底物等与上述蛋白质芯片反应, 就可以分析研究蛋白质之间或蛋白质与小分子之间的相互作用。

2001年7月美国《科学》杂志报道,Zhu等设计出了一种被称为酵母蛋白质组(所谓蛋白质组是细胞中全部基因即基因组表达形成的蛋白质的集合)的蛋白质芯片。首先将酿酒酵母5800个基因克隆并表达产生对应的蛋白质,分离纯化这些蛋白质,然后将它们固定于载体膜上即得蛋白质芯片。应用时将其他蛋白质或小分子物质与芯片进行反应,就可以分析蛋白质之间或蛋白质与小分子之间的相互作用。利用这种芯片,研究人员观察到了一种吸附钙的蛋白质和一种脂类物质相互作用的情况,在观察中研究人员还发现了几种新的蛋白质功能。

1999年Lueking等将已知的蛋白点印在PVDF(polyvinylidene difluoride)膜上,制成蛋白质芯片,并将抗体与该芯片进行孵育反应,再将辣根过氧化物酶(HRP)标记的第二抗体与芯片-抗体复合物反应,通过显色反应检测抗体的存在情况,从而对抗体进行筛选。该方法不仅适合于抗原、抗体的筛选,同样也可用于受体-配体的相互作用的研究。

光学蛋白质芯片系统是20世纪90年代中后期提出的分析研究蛋白质的一种新技术,它将高分辨率的生物光学显微成像技术和蛋白质芯片相结合,具有并行、快速识别和检测生物的功能。首先在载体片的不同区域固定不同的生物活性物质(探针或配体)形成多元的蛋白质芯片,然后将芯片浸入有多种待分析成分的溶液中,当待分析成分和芯片上的配体(探针)之间发生结合形成复合物时,芯片表面的形貌发生改变,这种改变可以通过光学显微成像技术观察出来,再通过计算机处理就可以判断出样品中待测成分的组成和含量。采用该技术可以对蛋白质之间的相互作用过程进行实时监测和测量,从而获得反应速率与反应条件之间的分子反应动力学参数,为一些尚无答案的生物学理论问题提供解答。另外,该技术也是一种快速检测和诊断方法。

(三) 生物芯片在食品安全检测中应用的前景

随着经济全球化的发展,食品跨国和跨地区的流通越来越频繁,各种食品安全事故和隐患也呈迅速扩展和蔓延之势,对人类健康和安全构成了极大的威胁。另一方面,随着社会生产力的发展和生活水平的提高,人们对食品安全性的要求也越来越高。这些已促使了各种食品安全保障体系(例如HACCP,GMP)的推广和应用,也促进了食品安全检测技术的改良、改进和提高,以及一些新的检测方法的研究和产生。检测技术总体发展方向是,①迅速,即要求检测方法能快速地检测出食品中污染物的种类和含量;②灵敏度高,即检测方法能检测出食品中极微量的污染物的含量;③特异性强,也就是抗杂质的干扰能力强,这样就有可能省去对分析样品的提取和纯化等过程,从而节约检测时间,也可以减少假阳(阴)性的出现;④同时分析多种污染物,污染食品有害物质很多,分析方法最好能一次取样一次试验就得出多种污染物的含量,从而节约检测时间和检测费用;⑤操作简便,要求检测方法简单易学,一般的技术人员只需通过阅读说明书就可以完成检测过程,而无需进行专门的培训;⑥无试剂化,检测过程中除了少量必要的试剂外,无需使用过多的试剂,目前有些检测方法,例如前面所述的生物传感器分析技术和试剂条检测方法,除了检测仪器和试剂条外,无需任何其他试剂;⑦分析仪器的微型化和便携化,随着微电子技术应用和分析过程的微量化和集成化,食品分析仪器越来越小巧,这便于携带到采样现场进行分析和测试。

围绕上述指导思想,已有生物传感器技术和免疫学检测技术等成功地用于食品安全检测和分析。就生物芯片而言,目前虽然还没有生物芯片用于食品检测方面的报道,但是生物芯片至少在以下几个方面表现出良好的应用前景:①食品中毒事件的调查:通常食品中毒事件的发生是突发

性和爆发性的, 对这类事件的处理, 首先是要找到“毒源”(即致病因子), 而致病因子又往往不容易被发现。例如, 由细菌引起的食品中毒事件的调查, 由于能引起食品中毒的细菌种类很多, 因此要判断到底是哪种细菌引起的食品中毒常常需要耗费大量的人力和物力来进行分析, 更主要的是需要很长的检测时间才能得到检测结果, 这对于食品中毒事件的控制和中毒人员的治疗都是不利的。如果能将常见的引起食品中毒的细菌的特异性 DNA 片断集成于一块载体片上做成 DNA 芯片, 就有可能仅需一次试验就可以判断出引起食品中毒的细菌种类, 大大地节约检测时间和检测费用。

②食品污染生物毒素的检测: 食品中可能污染的生物毒素包括真菌毒素、细菌毒素、植物毒素、藻类毒素和动物毒素等, 其中每一类毒素又包括很多种毒素。以粮食为例, 可引起污染的真菌毒素有黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、杂色曲霉毒素、腐马菌素和 T-2 毒素等, 目前的检测方法, 每次仅能检测出一种毒素的含量, 因此为了节省检测时间和费用, 通常仅对其中的一种或几种真菌毒素进行检测和分析。如果能将抗常见真菌毒素的抗体集成于一块蛋白质芯片上, 仅需一次试验就可以判断出粮食中常见的污染真菌毒素的种类和含量。同样也可以将常见的细菌毒素和藻类毒素等的抗体分别制成芯片或集成于一块芯片上, 这样一次试验就可以判断出食品中污染的多种毒素的含量。

③食品中污染病原菌的检测: 污染食品的病原细菌很多, 常见的包括致病性大肠杆菌 (pathogenic *Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌 (*Salmonella* spp.)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、志贺氏菌 (*Shigella* spp.) 和李斯特菌 (*Listeria* spp.) 等, 其中每种病原菌根据致病因子的不同又可以分为不同的群或型, 例如, 致病性大肠杆菌就可以分为肠道致病性大肠杆菌 (enteropathogenic *E. coli*)、肠道侵袭性大肠杆菌 (enteroinvasive *E. coli*)、产肠毒素的大肠杆菌 (enterotoxin *E. coli*) 和出血性大肠杆菌 (enterohemorrhagic *E. coli*)。目前的检测方法每次只能检测一种病原菌, 如果能将这些病原菌的特异性致病基因片断固定于一块芯片上, 只需一次试验就可以判断出食品中各种病原菌的污染情况, 从而大大地节约检测时间和费用, 保障人类的健康和安全。

④食品中残留农药和抗生素的分析: 同样的原理, 将抗各种农药的抗体或抗生素的微生物受体固定化形成蛋白质芯片, 然后将食品样品点样于芯片上就可以一次性地分析检测出食品中的各种农药和抗生素残留。总之, 随着研究的深入, 生物芯片技术必将在食品安全保障中发挥愈来愈重要的作用。

主要参考文献

- [1] 鲍敏杭, 吴宪平. 集成传感器. 北京: 国防工业出版社, 1987
- [2] 张先恩. 生物传感器技术原理与应用. 长春: 吉林科学技术出版社, 1991
- [3] 许春向等. 生物传感器及其应用. 北京: 科学出版社, 1993
- [4] Cass A. E. G. Biosensor—A Practical Approach. New York: Oxford University Press, 1990
- [5] Byong H. Lee. Fundamentals of Food Biotechnology. New York: VCH Publishers, 1996
- [6] 邓家祺. 生物传感器. 科学 (双月刊). 1998, 49 (4): 26~29
- [7] 彭志英. 食品生物技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- [8] 任怨. 膜受体与传感器. 北京: 科学出版社, 1996

- [9] Avrameas S. J. Amplification Systems in Immunoenzymatic Techniques. J. Immuno. Methods, 1992, 150 : 23~32
- [10] Katsu T. The Use of Tetraalkylammonium Ion-sensitive Electrodes for Liposome Marker Release Assay. Anal. Chem. 1993, 65 (1) : 176~180
- [11] 张树政. 酶制剂工业 (上册). 北京: 科学出版社, 1998
- [12] 罗九甫. 酶和酶工程. 上海: 上海交通大学出版社, 1996
- [13] 许博、朱果逸. 压电免疫质量传感器中生物大分子的固定化方法. 分析化学. 1999, 27 (4) : 479~484
- [14] 舒友琴, 罗国安, 立清文. 生物传感器在食品分析中的发展和应用. 食品科学. 1999 (11) : 13~17
- [15] 余孝颖, 雷晟. 胆碱脂酶均效应管传感器. 分析化学. 1996, 24 (5) : 521~524
- [16] 刑少琛, 刘洁生. 免疫传感器在食品污染检测中的应用. 食品科学. 1999 (8) : 6~18
- [17] Fernando J. C., Rogers K R., Anis N. A. et al. Rapid Detection of Anticholinesterase Insecticides by a reusable Light Addressable Potentiometric Biosensor. J. Agric. Food Chem. 4 (3) : 511~516
- [18] Zhao C. Q., Anis N. A., Rogers K. R. et al. Fiber Optic Immunosensors for Polychlorinated Biphenyls. J. Agric. Food Chem. 1995 (43) : 2308~2315
- [19] 刘勤, 周永新, 刘荫棠. 分子烙印传感器的研究进展. 分析化学. 1999, 27 (11) : 1341~1347
- [20] Guilbanlt G. G., Lubrano G. J., Kauffmann J. M. et al. Enzyme Electrodes for the Sugar Substitute Aspartame. Analytica Chimica Acta. 1988 (206) : 369~374
- [21] 刘洁生, 彭志英. 生物传感器在食品工业中的应用. 食品与发酵工业. 1997, 23 (4) : 61~66
- [22] 张介驰, 于德水, 田小光等. 双乙酰生物传感器的研究. 生物工程学报. 1999, 15 (3) : 327~331
- [23] Brooks J. L., Mirhabibollahi B., Kroll R. G. Experimental Enzyme-linked Amperometric Immunosensors for the Detection of *Salmonella* in Foods. J. Appl. Bacterial. 1992, 73 (3) : 189~196
- [24] Swensin F. J. Proceeding of the First European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors. Sensors—Actuator. 1993, B11 (1~3) : 315~321
- [25] 金利通、孙文梁、孙星炎等. 味觉电化学传感器的研究 (II). 分析化学. 1994, 21 (1) : 64~66
- [26] 苏世彦. 食品微生物检验手册, 北京: 中国轻工业出版社, 1998
- [27] 雷祚荣. 细菌毒素分子生物学, 北京: 中国科学技术出版社, 1993
- [28] 陈福生, 罗信昌, 周启等. 黄曲霉毒素 B₁ 的免疫检测 II 抗体的产生及应用. 菌物系统. 1999, 18 (4) : 409~414
- [29] Ogert R. A., Brown J. R., Singh B. K. et al. Detection of *Clostridium botulinum* Toxin A Using a Fiber Optic-based Biosensor. Analytical Biochemistry. 1992, 205 (2) : 306~312
- [30] Bemitez L., Martin G. A. Gilardi P. et al. The Ciliated Protozoa *Tetrahymena Thermophila* as a Biosensor to Detect Mycotoxins. Letters in Appl. Microbiol. 1994, 19 (6) : 489~491
- [31] 徐宝梁, 李兵. 鱼肉鲜度测定生物传感器研究概况. 食品与发酵工业. 1997, 23 (3) : 45~49
- [32] Watanabe E., Nagumo A., Hoshi M. et al. Microbial Sensors for the Detection of Fish Freshness, J. Food Sci. 1987, 52 (3) : 592~595
- [33] 黄国能, 张钟兴. 鲢鱼和鳙鱼在冰藏过程中鲜度的变化及 K 值和 RI 值 (IMP 相对比值) 相关性研究. 食品科学. 1987 (2) : 1~6
- [34] 沈莲清, 彭图治. 电流型酶电极检测鱼贝新鲜度的方法研究. 食品科学. 1995, 16 (2) : 53~56
- [35] Watanabe E., Tokimatsu S., Toyama K. Simultaneous Determination of Hypoxanthine, Inosine, Inosine-5'-phosphate and Adenosine-5'-phosphate within Multielectrode Enzyme Sensor, Analytica Chimica Acta. 1984 (164) : 139~146
- [36] Karube I., Matsuoka H., Suzuki S. et al. Determination of Fish Freshness with an Enzyme Sensor System, Agric. Food Chem. (32) : 314~319

- [37] 于善谦、王洪海、朱乃硕等. 免疫学导论. 北京: 高等教育出版社, 德国: 施普林格出版社, 1999
- [38] 孙树汉主编. 核酸疫苗. 上海: 第二军医大学出版社, 2000
- [39] 陆德源主编. 现代免疫学. 上海: 上海科学技术出版社, 1995
- [40] 巴德年主编. 当代免疫学技术和应用. 北京: 北京医科大学和中国协和医科大学联合出版社, 1998
- [41] 张素雅编译. 免疫学原理. 上海: 上海科学技术出版社, 1979
- [42] 白荣德. 免疫学. 济南: 山东科学技术出版社, 1984
- [43] 朱培坤. 免疫酶技术. 济南: 山东科学技术出版社, 1983
- [44] 陈福生, 罗信昌, 周启等. 黄曲霉毒素 B₁ 的免疫检测: I 抗原的构建. 菌物系统. 1999, 18 (3): 316~320
- [45] Chu F. S. et al. Preparation and Characterization of Aflatoxin B₁-1- (O-carboxymethyl) oxime, J. AOAC. 1977, 60 (4)
- [46] Peskta J. J. Enhanced Surveillance of Foodborne Mycotoxin by Immunochemical Assay. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1988, 71 (6): 1075~1080
- [47] 周光炎主编. 免疫学原理. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2000
- [48] 龚非力主编. 基础免疫学. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998
- [49] 毕爱华主编. 医学免疫学. 北京: 人民军医出版社, 1996
- [50] 余传霖, 叶天星, 陆德源等主编. 现代医学免疫学. 上海: 上海医科大学出版社, 1998
- [51] 汪美先主编. 免疫学基础. 西安: 陕西科学技术出版社, 1983
- [52] Tizard I. R. Immunology—An Introduction (2nd ed.). New York: Saunders College Publishing, 1988
- [53] Chen Fusheng, Chen Jiuwu, Zhao San et al. Characterization of Chicken Antiseria Raised Against *Aspergillus* spp. by ELISA. Nahrung. 2000, 44 (5): 323~327
- [54] 林清华. 免疫学实验. 武汉: 武汉大学出版社, 1999
- [55] Weir D. M. Handbook of Experimental Immunology (Volume 3) —Application of Immunological Methods (3rd ed.). London: Blackwell Scientific Publication, 1978
- [56] 尹伯元, 王仁芝, 李振甲等主编. 标记免疫学. 北京: 原子能出版社, 1998
- [57] Wulf B. Storch 著. 阮幼冰主译. 免疫荧光基础. 北京: 人民卫生出版社, 2000
- [58] 朱立平, 陈学清主编. 免疫学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社, 2000
- [59] 徐宜为编著. 免疫检测技术. 第二版. 北京: 中国科学出版社, 1997
- [60] Barbara M. L., Tony C. B. P. and Grahame W. G. The Microbiological Safety and Quality of Food (II). Maryland: Aspen Publishers Inc., 2000
- [61] 苏世彦主编. 食品微生物检验手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1998
- [62] Lin H. H., Lister R. M. and Cousin M. A. ELISA for Detection of Mold in Tomato Puree. J. Food Sci. 1986, 51 (1): 180~183
- [63] Lin H. H. and Cousin M. A. Evaluation of ELISA for Detection of Mold in Foods. J. Food Sci. 1989, 52 (4): 361~374
- [64] Notermans S. et al. Detection of Mold in Nuts and Species: the Mold Colony Count versus the ELISA, J. Food Sci. 1988, 53 (6): 1831~1843
- [65] Dewey F. M. et al. Development of Monoclonal -Antibody -ELISA and-DIP-STICK Immunoassays for *Penicillium islandicum* in Rice Grains. J. Gen. Microbiol. 1990 (136): 753~760
- [66] 陈福生, 罗信昌, 周启等. ELISA 快速检测储存粮食中的污染曲霉. 中国粮油学报. 1999, 14 (1): 51~54
- [67] Dewey F. M. et al. Development of Monoclonal -Antibody-ELISA and-DIP-STICK Immunoassays for *Humicola lanuginosa* in Rice. J. Gen. Microbiol. 1989 (135): 361~374

- [68] Ricker R. W. et al. Immunodetection and Quantification of *Botrytis cinera* on Harvested Wine Grapes. *Phytopathology*. 1991, 81 (4): 404~411
- [69] 仲维科, 郝戴, 樊耀波. 食品农药残留分析进展. *分析化学*. 2000, 28 (7): 904~910
- [70] Barandon D. L., Binder R. G., Betes A. H. et al. Monoclonal Antibody-based ELISA for Thiabendazole in Liver. *J. Agric. Food Chem* 1992 (40): 1722~1726
- [71] Lawruk T. S., Gueco A. M., Jourdan S. W. et al. Determination of Chlorothalonil in Water and Agricultural Products by Magnetic Partical-based Enzyme Immunoassay. *J. Agric. Food Chem*. 1995 (43): 1413~1419
- [72] Zomer E., Quintana J., Saul S. et al. LC-receptorgram: a Method for Identification and Quantitation of β -lactams in Milk by Liquid Chromatography with Microbial Receptor Assay. *J. AOAC*. 1995, 78 (5): 1165~1172
- [73] Korsrud G. O., Salisbury C. D. C., Fesser A. C. E. et al. Investigation of Charm Test II Receptor Assay for the Detection of Antimicrobial Residues in Suspect Meat Samples. *Analyst*. 1994, 119 (12): 2737~2741
- [74] 洪葵. 免疫学技术及其在食品中的应用. *食品科学*. 1996, 17 (2): 3~6
- [75] 张蘅, 童君坦. *医学分子生物学*. 北京: 北京医科大学出版社, 1999
- [76] 卢圣栋. *现代分子生物学实验技术*. 北京: 高等教育出版社, 1993
- [77] Hames B. D., Higgins S. T. *Nucleic Acid Hybridization—A Practical Approach*. Oxford: IRL, 1985
- [78] 来茂德. *医学分子生物学*. 北京: 人民医学出版社, 1999
- [79] Davis L. G., Kuehl W. M., Batty T. F. *Basic Methods in Molecular Biology*. Los Altos: Appleton & Lange, 1994
- [80] 朱平. *PCR 基因扩增实验操作手册*. 北京: 中国科学技术出版社, 1992
- [81] Erlich H. *PCR technology—Principle and Application for DNA Amplification*. New York: M. Stockon, 1989
- [82] 黄培堂, 俞炜源等. *PCR 技术原理与应用*. 北京: 科学技术出版社, 1990
- [83] 马力人, 蒋中华. *生物芯片*. 北京: 化学工业出版社, 2000
- [84] Wilde J., Eiden J. and Yolken R. Removal of Inhibitory Substances from Human Fecal Specimens for Detection of Group A Rotaviruses by Reverse Transcriptase and Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol*. 1990 (28): 1300~1307
- [85] Wernars K., Heuvelman C. J., Chakraborty T. et al. Use of PCR for Direct Detection of *Listeria monocytogenes* in Soft Cheese. *J. Appl. Bacteriol*. 1991 (70): 121~126
- [86] Olsvik O., Popovic T., Skjerve E. et al. Magnetic Separation Techniques in Diagnostic Microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 1994 (7): 43~54
- [87] Josephson K. L., Gerba C. P. and Pepper I. L. PCR Detection of Nonviable Bacterial Pathogens. *Appl. Environ. Microbiol*. 1993 (59): 3513~3515
- [88] Morgan S. and Jones D. D. Detection of Viable and Nonviable *Vibrio cholerae* in Artificially Contaminated Shellfish Using PCR. *Abstr. Ann. Mtg. Amer. Soc. Microbiol*. 1995, (391)
- [89] Baloda S. B., Krovacek K., Eriksson L. et al. Detection of Aerolysin Gene in *Aeromonas* Strains Isolated from Drinking Water, Fish and Food by PCR. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis*. 1995 (18): 17~26
- [90] Agata N., Ohta M., Arakawa Y. et al. The *becT* Gene of *Bacillus cereus* Encodes an Enterotoxigenic Protein. *Microbiology*. 1995 (141): 983~988
- [91] Nickerson D. A., Kaiser R., Lappin S. et al. Automated DNA Diagnostics Using an ELISA-based Oligonucleotide Ligation assay. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990 (87): 8923~8927
- [92] Rotbart H. A. Enzymatic RNA Amplification of the Enteroviruses. *J. Clin. Microbiol*. 1990 (28): 438~442
- [93] Samuelson J., Acuna-Soto R., Reed S. et al. DNA Hybridization Probe for Clinical Diagnosis of *Entamoeba*

- histolytica*. J. Clin. Microbiol. 1989 (27): 671~676
- [94] 杜蕾, 齐国华, 刘汉芬. 产气荚膜梭菌毒素基因地高辛探针制备和检测方法的建立的初步研究. 食品科学. 2000, 21 (5): 46~49
- [95] 李平兰. PCR 技术及其在食品微生物检测中的应用. 食品科学. 1998, 19 (7): 3~5
- [96] 徐茂军. 基因探针及其在食品卫生检测中的应用. 食品与发酵工业. 2001, 27 (2): 66~71
- [97] 王嘉福, 冉雪琴, 吴拥军等. 应用聚合酶链反应检测食品中肠毒素大肠杆菌. 食品科学. 1997, 18 (1): 43~46
- [98] 寇运同, 马洪明, 刘晨光. 用 PCR 技术快速检测食品中单核细胞增生性李斯特氏菌. 食品科学. 2001, 22 (5): 52~55
- [99] 马琦, 张锡元, 徐耀先. 原位 PCR 技术及其应用前景. 生物化学与生物物理进展. 1996, 23 (6): 488~492
- [100] 王升启. 基因芯片技术及应用研究进展. 生物工程进展. 1999, 19 (4): 45~51
- [101] 杨蓉, 谢文章, 张亮等. 生物芯片研究进展. 生物工程进展. 1999, 19 (4): 33~38
- [102] 周建军, 吴才宠, 丰美福. 生物芯片. 国外医学分子生物学分册. 2000, 22 (1): 5~9
- [103] 冯勇强, 阎小君, 苏成芝. 基因芯片技术. 国外医学分子生物学分册. 2000, 22 (1) 1~4
- [104] 刘彦华, 全文斌, 吴小惠等. 生物芯片技术及其应用前景. 中华检验医学杂志. 2000, 23 (3)
- [105] 徐炳森, 邵健忠. 几种新型生物芯片的研究进展. 生物化学与生物物理进展. 2000, 27 (3): 125~253
- [106] Cheng J. , Waters L. C. , Fortina P. et al. Degenerate Oligonucleotide Primed-polymerase Chain Reaction and Capillary Electrophoretic Analysis of Human DNA on Microchip-based Devices. Anal. Biochem. 1998, 257 (2): 101~106
- [107] Cheng J. , Shoffner M. A. , Hvichia G. E. et al. Chip PCR II Investigation of Different PCR Amplification Systems in Microfabricated Silicon-glass Chips. Nucleic Acids Res. 1996, 24 (2): 380~385
- [108] Hacia J.G. Resequencing and Mutational Analysis Using Oligonucleotide Microarrays. Nat. Genet. 1999, 21 (1 Suppl): 42~47
- [109] Lueking A. , Horn M. , Eickhoff H. et al. Protein Microarrays for Gene Expression and Antibody Screening. Anal. Biochem. 1999, 270 (1): 103~111
- [110] Wilding P. , Kricka L. J. , Cheng J. et al. Integrated Cell Isolation and Polymerase Chain Reaction Analysis Using Silicon Microfilter Chambers. Anal. Biochem. 1998, 257 (2): 95~100
- [111] MacBeath G. & Schreiber S. L. Printing Proteins as Microarrays for High-throughput Function Determination. Science. 2000 (289): 1760~1763
- [112] Pease A. C. , Solas D. , Sullivan E. J. et al. Light-generated Oligonucleotide Arrays for Rapid DNA Sequences Analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994, 91 (11): 5022~5026
- [113] Schena M. , Heller K. A. , Thieriault T. P. et al. Microarrays: Biotechnology's Discovery Platform for Functional Genomics. TIB Tech. 1998, 16 (3): 301~306
- [114] Stephen P. A. et al. Lighted-directed Spatially Addressable Parallel Chemical. Science. 1991 (251): 767~773
- [115] McCall G. , Labadie J. et al. Light-directed Synthesis of High-density Oligonucleotide Arrays Using Semiconductor Photoresist. Proc. Natl. Acad. USA. 1996 (93): 13555~13560
- [116] Larry J. K. Miniaturization of analytical Systems. Clin. Chem. 1998 (44): 2008~2014
- [117] Gregory T. A. , Petersen K. K. , Albin M. et al. Silicon Micromachining. Anal. Chem. 1996 (68): 407~412
- [118] Cheng J. , Sheldom E. L. , Wu L. Preparation and Hybridization Analysis of DNA/RNA from *E. coli* on Microfabricated Bioelectronic Chips. Nat. Biotechnol. 1998, 16 (6): 541~546

- [119] Chee M. , Yang R. , Hubbell E. et al. Accessing Genetic Information with High-density DNA Arrays. *Science*. 1996 (274) : 610~613
- [120] Hacia J. G. , Makalowski W. , Edgemon K. et al. Evolutionary Sequence Comparisons Using High-density Oligonucleotide Arrays. *Nature Genetics*. 1998 , 18 (3) : 155~158
- [121] Schena M. , Shalon D. , Davis R. W. et al. Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science*. 1995 , 270 (5235) : 467~470
- [122] Heller R. A. , Schena M. , Chai A. et al. Discovery and Analysis of Inflammatory Disease-related Genes using cDNA Microarrays , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997 (94) : 2150~2155
- [123] Lipshutz D. , Morris D. , Chee M. et al. Using Oligonucleotide Probe Array to Access Genetic Diversity. *Biotechniques*. 1995 , 19 (3) : 422~447
- [124] Yershov G. , Barsky V. , Belgovskiy A. et al. DNA Analysis and Diagnostics on Oligonucleotide Microchips. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996 (93) : 4913~4918
- [125] Ferguson J. A. , Boles T. C. , Adams C. P. et al. A fiber-optic DNA Biosensor Microarray for the Analysis of Gene Expression. *Nat. Biotechnol.* 1996 (14) : 1681~1684
- [126] Drobyshv A. , Mologina N. , Shik V. et al. Sequence Analysis by Hybridization with Oligonucleotide Microchip : Identification of β -thalassemia Mutations. *Gene*. 1997 (188) : 45~52
- [127] Lueking A. , Horn M. , Eickhoff H. et al. Protein Microarrays for Gene Expression and Antibody Screening. *Anal. Biochem.* 1999 (270) : 103~111
- [128] 靳刚. 光学蛋白质芯片技术及其应用. *现代科学仪器*. 2001 (3) : 27~29
- [129] 王志珍, 邹承鲁. 后基因组—蛋白质组研究. *生物化学与生物物理学报*. 1998 , 30 (6) : 533~539
- [130] Jin G. , Jansson R. , Arwin H. Imaging Ellipsometry Revisited : Development for Visualization of Thin Transparent Layers on Silicon Substrates. *Rev. Sci. Instrum.* 1996 (67) : 2930~2936
- [131] 靳刚, 孟永刚, 邢建华等. 生物分子吸附膜层的图像显示. *测试技术学报*. 1998 , 12 (3) : 166~171
- [132] 王战会, 靳刚. 光学椭圆成像技术在分子研究中的应用. *生物工程学报*. 2000 , 16 (4) : 429~432
- [133] 姚志建. 科学仪器发展与基因组研究. *现代科学仪器*. 2001 (3) : 7~11
- [134] 丁士建, 夏其昌. 蛋白质组学的发展与科学仪器现代化. *现代科学仪器*. 2001 (3) : 12~17
- [135] 王大东, 王嘉玺. 蛋白质组与蛋白质组学. *国外医学分子生物学分册*. 2000 , 22 (3) : 129~133

转基因食品的发展与食品安全

第一节 转基因食品的发展动态

自 20 世纪 80 年代以来，现代生物技术产业蓬勃发展，特别在医药、农牧业、食品等方面，已经展现了巨大的经济效益和社会效益。

基因工程技术应用的领域十分广泛，其中作物的育种是目前最重要的领域之一，并已经产生巨大的经济效益。通过化学或辐射进行人工诱变是一种育种途径，遗传诱变可能引起所有作物性状随机的和不可预测的遗传变异，这些变异可能是因染色体的倒位、易位和重排所致，所以诱变育种是不精确的、不可预见的。而基因工程不仅可以打破物种间的界限，可以在动物、植物、微生物之间进行基因工程操作，极大地扩大了基因库的选择范围。而且，近十年来，随着人们对细胞和生物体在分子、生理生化层次原理的更深入的了解，以及作物转基因技术的发展，构成了植物科学家革命的源泉。所以，尽管一棵植株常有 2 000 个基因，科学家可以准确地把 2 个或 3 个目的基因转移到某一作物上。新增加的基因是人类熟知的，从这个意义上来讲，新的基因改良作物的培育过程更容易控制，人们对它的了解也更多，因此，与传统的人工培育方法相比，出现人们未预见后果的可能性更小。并且与传统育种方法相比，育种时间更短。用基因工程技术对作物进行改良和优化后，可提高作物的产量，改善产品的营养成分，缩短生产周期。

生物技术在食品工业中的应用历史悠久，人类早在远古时代就利用微生物制醋、制酱、酿酒等，今天人们又致力于固定化（酶或微生物）、重组 DNA 和细胞融合等技术来改善生物的性状，开发高效、节能、少公害的食品。20 世纪 70 年代以来，基因克隆和重组技术的诞生和飞速发展，为定向改变生物性状提供了理论依据和技术基础。1982 年转基因“超级鼠”的构建成功，1985 年转基因鱼的问世，揭开了基因工程食品生产的序幕，基因工程食品由此走上了历史的舞台，并在日常生活中发挥着越来越重要的作用。这里所称的基因工程指的是：采用自然条件下或自然过程中不可能发生的方法改变生物体的分子生物学或细胞生物学性状，主要包括重组 DNA、基因缺失、基因加倍、导入外源基因以及改变基因位置等分子生物学技术手段。

一、转基因食品的概念

自古以来，人们就从不断繁衍的动物和植物群体中获取自己需要的食物，那些认为具有优良性状的动物和植物品种被选择并不断繁衍，而且继续进行改良，以满足人们摄取更高水平食物的需要。但这种过程需要育种者们经过长期的工作，一代一代地通过选择、有性杂交、观察和选择，时间可能是很长。而今天的科学工作者通过分子生物学的研究，知道生物的任何性状都是由

基因决定的，也就是说，各种生物的任何性状都是特定的基因表达。

不同生物具有不同特性，基因是决定不同生物特性的内在物质基础。基因由细胞核里的脱氧核糖核酸(DNA)构成，一个基因就是DNA分子的一个片段。故人们就很自然地想到了利用基因工程(主要是DNA重组技术)手段，将一种生物体内控制某种性状的基因作为外源基因，移植到另一种生物体内并使之表达，这样就可以实现“强强联合，优势互补”，使一种生物体具有其他生物体自然生长所没有的特点，这就是“基因修饰生物体”和“基因修饰食品”基础。由这种技术产生的食品可以分为原料类和加工成品类，我国习惯上将他们统称为转基因食品。

二、转基因食品的研究开发进展

转基因作物的发展很快，至1996年初期，30多个国家进行的转基因研究已达3600多项，而且每年都以高速度增长。基因工程作物(又叫转基因作物)的品种目前已有很多，以玉米、烟草、大豆、番茄、油菜和棉花为主。在研究内容上，抗除草剂的占35%，抗病虫占31%，产品性质改良占20%。转基因作物的研究开发要经过实验室、小规模封闭试验、大规模大田试验和商业化种植四个阶段。目前抗病虫、抗除草剂的玉米、大豆、小麦、番茄等转基因作物等已经转入商业化生产。

外源基因表达的产物以及基因工程技术的影响，涉及动物、植物、微生物和食品加工中的各个环节，从牛奶、奶酪到果蔬等，转基因食品比比皆是。美国玉米种植者联合会估计，美国转基因玉米的种植面积由1998年占总种植面积的28%上升到1999年的33%。美国大豆联合会估计转基因大豆的种植面积占总种植面积的55%。美国的专家认为，美国有 $2/3 \sim 3/4$ 的奶酪在生产过程中使用了遗传工程凝乳酶。美国约 $1/3$ 的奶牛使用了牛生长激素。

转基因技术及其产品的商业化生产，带来了巨大的经济效益。据统计，1995年全球转基因生物产品的销售额达到7500万美元，1996年为2.35亿美元，1997年激增至6.70亿美元，1998年达到16.4亿美元，1999年达到21亿~23亿美元，2000年达到30亿美元。预测2005年将达到80亿美元，2010年将达到250亿美元。可见，转基因技术将给全球带来巨大的经济效益。

三、我国转基因食品的发展状况及对基因工程技术的政策

我国从“六五”计划期间对生物技术进行立项，到“九五”期间，生物技术占了举足轻重的地位，取得了很大的成果。我国是世界上转基因作物第一个商品化种植的国家，1994年转基因烟草的种植面积达到了100万公顷，占当时我国烟草种植总面积的5%，也是世界上当时转基因作物种植面积最大的国家。1997年我国自行研究开发成功的转基因耐储番茄进入商业化生产；1998年6月转基因抗虫棉“中棉所30号”试种后通过验收，并计划向全国推广。另外，在改善品质的转基因水稻、抗病毒转基因马铃薯、抗黄矮病的转基因小麦、抗虫转基因玉米、抗虫转基因番茄等研究开发领域，均取得了很大的成绩。

我国对转基因食品在管理上持谨慎态度，在研究上则予以支持，1992年颁布《新食品资源卫生管理办法》，规定了转基因食品生产管理审批制度和标识办法；1993年原国家科委颁布《基

因工程管理办法》要求进行安全性评价和制定安全控制的措施；1996年农业部颁布的《农业生物基因工程安全管理实施办法》规定生物技术农产品要报农业部批准。从目前来看，转基因食品的有利方面得到广泛的共识，其安全性争论则没有结果。随着我国正式加入WTO，有关部门正在建议早日组织力量研究检测方法，为今后制定方针管理国际贸易、保护人民健康和促进国民经济的发展提供支持。同时为我国农业和食品部门在转基因工作方面有更多的时间进行研究。

四、转基因食品的发展面临的困难

转基因作物的出现并没有像其他一些伟大的发现一样立即受到热烈欢呼，相反，转基因作物的安全性从一开始便受到广泛争论。而转基因食品的安全性是转基因作物安全性的争论焦点之一。支持者和反对者针锋相对，世界一下也好像分成了相互对立的两个世界。其中有很多的原因，如各国政府的政策法规、对生物技术的政策、人们对转基因食品的理解、对转基因技术科学的理解和伦理学上的观点等原因。

（一）转基因食品受到怀疑和反对

1. 公众心理上对风险的理解 尽管基因工程技术有助于解决人类社会面临的许多问题，但是对于直接或间接影响到人类自身健康的转基因食品，相当的人对它抱着敬而远之的态度，不愿意自己成为转基因食品的试验品。再加上疯牛病事件的影响，没有绝对的把握，不少人难于接受转基因食品。公众的观望和怀疑态度直接导致了政府对转基因食品政策的混乱。安全性问题已经成了转基因食品发展的“瓶颈”。

2. 人们对转基因食品的科学观念上的理解 除了转基因食品的安全性之外，另一个原因是公众对转基因这一门科学的理解程度还不够，转基因番茄在美国和英国的成功销售很能说明这个问题。转基因番茄是在英国第一个上市的转基因产品，用这种番茄制成的番茄酱罐头有两个标签：一个标签标明该产品是用转基因番茄做成的，另一个标签说明该产品可延长保质期，降低损失。这种罐头与常规罐头在一起出售，每个出售这种罐头的商店有解释该转基因技术的说明书，同时在电视上、报刊和广播上对此进行大量的宣传。这种产品的销售势头非常好。可见，通过恰当有效的宣传教育，加深公众对基因工程食品的了解和认识，有助于人们树立对转基因工程食品的信心并接受它。

（二）新的基因食品法规出台

各国对转基因食品的法规存在着很大的偏差。1997年2月14日欧盟出台了《新食品法》，并于1998年9月正式生效。该法将“新食品”定义为“本质上不再等同于”已经上市食品。其中规定如果基因工程使得新食品或食品成分不再等同于已经上市食品，该基因工程食品应加贴特殊标签。1997年该法对欧盟成员国生效。

由于这部新法规太粗略了，没能将重要细节问题说清楚，因而受到了工业界和消费者团体的批评。首先，该法没有说明为什么含有基因工程成分的食品就是新食品。例如，产生额外蛋白质、能长久保鲜的转基因番茄被称为新食品，但被除去某一基因的番茄是否为新食品？如果转基因作物（如转基因大豆）被用于生产食用油，那么用这种转基因食用油生产的食品是否还是新食品？其次，应采取什么样的测试手段及根据测试到的什么成分来判定一种食品是否是含有基因工

程成分？如何应用测试结果？1997年11月初，欧盟各国食品管理机构的代表组成的“食品常设委员会”认为测试DNA和蛋白质都不能作为判定某食品是否是新食品的有效手段，最后只得草草决定：应以测试DNA为基础，如果测不到DNA，再测试蛋白质。再者如何判定某食品应加贴特殊标签，标签中应说明哪些内容？欧盟委员会也没能就标签中应说明哪些内容达成共识。

虽然《新食品法》声称将在适当的时候出版详细的技术细节，但至今也没有看到适于食品公司实施应用的细则。这使欧洲的食品公司对新食品法的理解造成混乱，各公司根据自己的理解来解释新食品法，这反而形成了法律真空。

标签问题一直以来是争论的焦点。一些公司反对对转基因食品加贴特殊标签。他们认为“检测出转基因成分在技术上是不可可能的。加贴标签意味着让消费者不要使用它”。美国农业部一位官员说“必须认真处理食品标签问题，以避免妨碍贸易自由”；而另一些人认为：“消费者有权知道是否是基因工程食品，有权决定是否选用它”。

（三）转基因食品进入市场受到障碍

农产品出口是美国经济的重要支柱之一，单就玉米及玉米制品这一项，美国向欧盟的年出口额便达到10亿美元。这种贸易本来相安无事，但美国的转基因玉米（其他作物也一样）发展迅速，1997年便有了一定的种植面积，1999年种植比例更是达到了40%。但转基因玉米在欧洲并不走运，因为1997年欧洲连续发生了一些疯牛病的事件，使消费者对食品的关注达到空前程度。那一年欧盟在消费者政策与健康保护委员会（DGXXIV）新设了一个部门“植物科学委员会”专门来审查转基因玉米进入欧盟市场问题。可见，美国和欧盟对转基因作物的态度截然不同：美国是大力倡导、全面推广，而欧盟则犹豫不决，瞻前顾后。

由于一些国家或一些强烈的反对者对转基因食品的竭力抵制，导致各国对转基因食品制定了一些限制政策，如标签风波。自转基因食品一面世，反对者便坚持所有的遗传工程食品必须贴标签，这一呼吁受到了不少的国家响应，但也受到了美国等国的拒绝。

美国食品与药物管理局（FDA）不要求对转基因食品加特殊标签，而是在各公司自愿的基础上审查与公众健康和安全相关的问题，这种非正式的程序只能说明是否存在有毒物质和过敏物质。加拿大也不要求对转基因食品加贴特殊标签。另据报道，新西兰议会在1997年10月驳回了一份议案，该议案要求食品制造商对转基因食品加贴特殊标签。新西兰之所以拒绝对转基因食品加贴特殊标签，国际贸易因素起了很大的作用。在整个欧洲对转基因植物怀有敌意的气氛下，西班牙、法国、葡萄牙、罗马尼亚和乌克兰是为数不多的敢为天下先的国家，1999年均有几万公顷不等的种植面积。其中，葡萄牙、罗马尼亚和乌克兰是第一次种植转基因作物。欧洲种植的转基因作物主要为Bt（苏云金杆菌）转基因玉米。在拉丁美洲，那些已经种植转基因作物的国家预计会适度增加现有种植面积，并引入一些新的单性状或多性状作物品种。公众的接受程度和转基因食品标签问题将会继续影响欧洲国家转基因作物的种植面积和转基因食品的消费。

第二节 转基因食品对人类健康和社会发展的影响

基因工程技术为定向改变生物学性状提供了理论依据和技术基础，基因工程技术的应用对食品资源的改造主要涉及微生物、植物和动物，通过对被加工材料的处理，生产出符合人类需要的

基因食品。转基因技术因其能获得用常规手段难以获得的优良性状而展示了诱人的前景。除了转基因植物性食品外，在食品领域应用的转基因产品还包括转基因动物性食品（如乳制品、肉制品及海产品等）。基因工程菌株应用在发酵食品中。

目前转基因食品涉及的领域主要有提高粮油食品的产量、改善其食用品质和加工功能特性，延长果蔬产品的储藏期，提高农作物的抗病虫害性能，改善动物和植物食品的营养成分的比例和食用品质，改善发酵食品的风味和品质。

一、转基因食品为人类带来的好处

（一）促进经济的增长

如前所述，转基因技术带来了农业生产的大丰收，提高了产量，并且改善了产品的质量。转基因作物及其加工产物为全球带来了巨大的经济效益，这种效益是传统生物技术所无法比拟的。

（二）解决了人口增长引起的资源短缺问题

随着世界可耕地持续减少，而人口却以每年大量增加，因而利用基因工程技术以提高食物的产量和品质、增加营养素含量，很大程度上解决了这个问题。

今天，将近 10 亿人生活在贫困线以下，他们经常遭受饥饿的痛苦。据统计，他们中大约 70% 是农民。将来人口的急剧增长必然进一步加剧食品的需求。根据预计，从 1995 年到 2020 年，地球人口每年增加 7 300 万。到 2020 年地球人口数将达到 75 亿，而且 97.5% 的人口增长发生在发展中国家。

发展中国家需要大量的粮食。他们对谷物的要求将增加 85%。可是，由于人们对环境的关注以及耕地面积的限制，预计用于耕地的土地面积将仅能增加 7% 左右。因此，必须采用新的技术来增加产量。农业生物技术在帮助发展中国家实现粮食自给方面，无疑将起到一个关键的作用。

解决发展中国家的营养不良问题，农业生物技术带来的转基因食品也是一个很重要的解决办法。

（三）改良了食品的品质、增加了食品的种类

1. 改良粮油食品和果蔬原料的品质 植物是食品加工的基本原料，原料的品质与食品质量息息相关。植物性食品原料可用基因工程方法进行改良，使粮油食品的食用和加工品质、果蔬的耐储性和保质期得以改良和提高。如基因改造过的马铃薯比一般马铃薯含有较高的固形物含量。又如，将硬脂酰 C_0A 脱氢饱和酶基因导入油料作物，转基因作物中的饱和脂肪酸含量有所下降，提高了食用油的品质。通过导入硬脂酸-ACP 脱氢酶反义基因，可使转基因油菜子中的硬脂酸含量从 2% 增加到 40%。

谷物类植物中淀粉合成酶有两种不同的形式，其中与淀粉颗粒结合的淀粉合成酶（GBSSI）基因又称腊质基因（WX），是水稻、小麦、玉米、马铃薯等植物中决定直链淀粉合成的基因。在玉米上利用淀粉合成酶的反义基因来抑制该酶的活性，使反义转基因玉米中的淀粉合成酶活力大大降低，其直链淀粉的合成几乎完全受到抑制，而另一种淀粉的含量基本不变，从而改善淀粉的品质。此外还可通过转基因技术改良小麦中麦谷蛋白和醇溶谷蛋白的组成比例来以改变其面团

的流变学特性，进而提高它的烘焙性质。

2. 利用生物界三大系统作为生物反应器生产医用营养保健品 将外源基因的信息转变成蛋白质的生物体叫做生物反应器。随着基因转移技术的日趋完美，通过生物体表达外源基因，来生产价值极高的蛋白质、多肽类物质及疫苗等有着广泛应用前景。近年来，将外源基因移植到植物、动物和微生物中，并由此产生一种经过基因改造的新生物技术已经形成，得到基因表达而制造有益于人类健康的保健成分或有效因子。为人类利用动物、植物和微生物来生产所需要的医药及保健品开辟了广阔的天地。

营养医用品或称营养保健品的定义：食品或食品成分有医疗和保健的功能，包括预防和治疗疾病。

植物具有合成、折叠、翻译后修饰及装配蛋白的机制，并可在种植条件下大量繁殖生长，因此利用植物廉价、大量地生产重要药用蛋白（特别是疫苗）的巨大潜力日益受到世人的关注。迄今为止，利用植物生产药物、保健食品的主要方法是利用农杆菌（*Agrobacterium* spp.）或基因枪介导的转基因植物技术。1996年美国得克萨斯州生达医药集团在转基因烟草中表达了乙型肝炎表面抗原基因（HBsAg）。1994年Mason等将HBsAg基因转染番茄植物，并在世界上首次生产了植物来源的可食用乙型肝炎疫苗。目前番茄、马铃薯、莴苣、烟草和香蕉等植物已被用来生产疫苗，通过食用这些转基因植物就起到了接种疫苗的作用。利用植物基因工程的方法生产人类所需的医疗食用保健品还刚刚起步，但发展的潜力不可低估。可以预言，在不久的将来，将会有更多的源自植物基因工程的医药食用保健品问世。随着表达技术的进一步完善，植物将成为高效的绿色生产线。

又例如，将一种有助于心脏病患者血液凝结作用的酶基因克隆到牛或羊中，便可以在牛乳或羊乳中产生这种酶。又例如，把人的血红素基因克隆到猪中，最后，猪的血可以用作人类血液的代用品。这些都是转基因动物生产特殊成分的例子。

美国FDA（食品与药物管理局）明文规定，营养医用品必须是科学研究的结晶，是生物高技术的产品，这些产品的组成、结构和作用机理必须得到科学的阐明，传统的、经验的、作用不明确或功能不稳定的产品不能作为营养医用品销售，FDA也不会受理和批准。营养医用品一般分为三类：食物保健品、功能性食品和药用食品。尽管营养医用品的发展速度惊人，但是市场潜力很大，目前只能满足市场需求的10%~15%，欧美等发达国家在此领域已经开始了激烈的竞争，几乎全球最大的公司都纷纷投资营养医用保健品的研究开发。一些巨型生物技术公司，更是将某些营养保健品作为拳头产品来发展，原因正如InterNutria公司总裁所说：“一种药物需要10年以上的开发时间和至少2.5亿美元的资金才有可能走向市场，而营养医用品只需要几百万美元和几年的时间。更重要的是，营养医用品的利润也非常大”。

3. 利用基因工程菌株来改善发酵食品的品质和风味 酱油风味的优劣与酱油在酿造过程中生成氨基酸的量密切相关，而参与此反应的羧肽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提高13倍。另外，在酱油酿造过程中，木聚糖可与酱油中的氨基酸反应生成褐色物质，从而影响酱油的风味。而木聚糖的生成与制造酱油的米曲霉中木聚糖酶的含量与活力有密切关系。现在米曲霉中的木聚糖酶基因已被成功地克隆，利用反义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。酱油制造中和压榨性有关的多聚半乳糖醛酸酶、葡聚糖酶、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。

双乙酰是影响啤酒风味的重要物质,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。双乙酰的产生与还原贯穿整个啤酒发酵过程,在正常的发酵过程中,双乙酰是由酿酒酵母细胞产生的 α -乙酰乳酸经非酶促的氧化脱羧反应自发产生的。去除啤酒中双乙酰的有效措施之一是利用 α -乙酰乳酸脱羧酶,但由于酵母细胞本身没有该酶的基因表达,因此利用转基因技术将外源 α -乙酰乳酸脱羧酶基因导入酿酒酵母细胞,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 Y_{ep13} 将产气肠杆菌 α -乙酰乳酸脱羧酶基因导入到酿酒酵母中,并使其表达。当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下降,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的 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酵母。使用这种转基因酵母酿制的啤酒,也能明显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。

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。

4. 改善动物性食品品质 在传统的畜牧业中,改良动物品质性状的主要手段只能是通过动物杂交育种和优化动物的饲养条件,但总的来说效果不理想,无法克服动物本身的限制。20世纪80年代发展起来的转基因技术为改良动物品质,培养优良品种提供了有效途径。该技术是从目的供体中获得带特定优良性状的DNA片段(目的基因),然后直接或通过载体导入受体物种的胚胎内,或通过对自身基因的加工修饰的方法来培育出优良的品种。

我国较大规模地进行转基因动物的研究与产业化的开发,是我国“863”计划最早实施的高技术项目之一。经过几十年的努力工作,取得了许多十分显著的成绩,先后获得了生长速度快、瘦肉率高、对某些病毒有一定抗性的转基因猪。

改善奶的营养成分或生理生化特征也是人们希望通过转基因动物来实现的目的之一。牛奶中含有大量的乳糖,大概有70%的人的消化道不能很好地消化这部分物质,未被消化的乳糖最后在小肠内被细菌分解为易挥发性的短链脂肪酸、水和二氧化碳,从而导致肠乳糖酶缺乏症,表现为腹痛、恶心、腹泻,严重的甚至会引起脱水。那么能否减少乳汁中乳糖的含量呢?Bernard等用乳腺特异性表达启动子(α -乳清蛋白基因启动子)与肠乳糖酶-根皮苷水解酶基因cDNA构建了表达载体,并通过显微注射的方法育成了转基因小鼠。目的基因在泌乳期的转基因母鼠乳腺的泡状细胞的顶端得到表达且具有活性。分泌出的乳糖酶进入乳汁,锚定在脂肪小体的外膜。乳糖酶使小鼠乳汁中乳糖的含量减少了50%~80%,而脂肪和其他蛋白质的含量则没有明显的变化,吃这种低乳糖小鼠奶的小鼠发育正常。

5. 改良食品加工工艺 啤酒制造中,大麦醇溶蛋白含量有一定的要求,如果大麦中醇溶谷蛋白含量过高,会影响发酵,使啤酒容易产生混浊,使其过滤困难。采用基因工程技术,使另一

蛋白基因克隆到大麦中，便可相应地使大麦降低醇溶谷蛋白，以适应生产要求。通过转基因技术改良麦谷蛋白和麦醇溶谷蛋白的组成比例以改善其面团的流变学特性，提高它的烘焙性能。

牛乳加工中，如何提高热稳定性是个关键问题。牛乳中的酪蛋白分子含有丝氨酸磷酸，它能结合钙离子而使酪蛋白沉淀。现在可以采用基因操作，增加 κ -酪蛋白编码基因的拷贝数和置换， κ -酪蛋白分子中Ala-53被丝氨酸所置换，便可提高其磷酸化，使 κ -酪蛋白分子间斥力增加，以提高牛奶的热稳定性，这对防止消毒奶沉淀和炼乳凝结起重要作用。

6. 改良菌种性能 第一个采用基因工程改造的食品微生物为用于面包制造中的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。由于把具有优良特性的酶基因转移至该菌中，使该菌含有的麦芽糖透性酶(maltose permease)及麦芽糖酶(maltase)的含量比普通面包酵母高，面包加工中产生二氧化碳气体的量也较高，最终制造出膨发性能良好的、松软可口的面包产品。这种基因工程改造过的微生物菌种(基因菌)在面包烘焙过程中会被杀死，所以，使用时是安全的。

啤酒发酵生产是采用酿酒酵母，但由于该微生物不存在 α -淀粉酶，使谷物淀粉液化成糊精。现在已能采用基因工程技术，将大麦中 α -淀粉酶基因转入酿酒酵母中并实现高效表达。这种酵母便可直接利用淀粉进行发酵，可缩短生产流程，简化程序，使啤酒生产的工艺得以革新。

干啤酒具有纯正、爽口、低热值等特点，有益于人体健康，其发酵的特点是麦汁发酵度要高(75%以上)。要求提高麦汁中可发酵性糖比例，就必须外加糖化酶或异淀粉酶来解决。Lancashire等把*S. occidentalis*或*S. diastaticus*的糖化酶基因引入酿酒酵母中表达和分泌，便可直接发酵生产干啤酒和淡色啤酒。

将霉菌的淀粉酶基因转入*E. coli*，并将此基因进一步转入酵母单细胞中，使之直接利用淀粉生产酒精，省掉了高压蒸煮程序，可节约60%的能源，缩短了生产周期。

7. 应用于酶制剂的生产 凝乳素(chymosin)(又称凝乳酵素)是一种酶，用于凝结牛奶产生干酪。过去加工者必须从乳牛的第四胃内获得凝乳素；现在可从那些遗传改良菌中提纯，并且这种工艺得到的凝乳酶在结构上同自然生成的一样。美国大约有60%的硬性干酪所使用的凝乳素是从遗传改良菌中提取而来的。还有很多的其他酶也已经用转基因技术来生产。

二、人们对转基因食品的争论

转基因食品虽然对人类健康带来了很大的好处，但是各国对于转基因食品的安全性问题的担忧程度看法不一。这里简述主要的争论和担心的问题。

(一) 对人类健康会产生影响

1. 食品携带的抗生素基因有可能使动物与人的肠道病原微生物产生耐药性 这是人类最关心的问题。最近，英国一位科学家在著名医学杂志《柳叶刀》上发表论文，宣称实验用的大鼠在食用转基因马铃薯以后，肝脏受到损伤，免疫系统受到削弱，由此掀起了国际社会对转基因食品安全性广泛争论的序幕。21位著名科学家支持这位科学家的工作。但英国皇家学会对此事专门组织科学家调查研究后认为，该科学家的实验从设计、执行到分析，多方面都有缺陷，不应过早得出结论。认为喂食转基因马铃薯与对照所得的数据虽然看上去有一些差异，但因受到实验技术的限制和不正确的生物统计学，这些差异说明不了问题。

2. 抗昆虫农作物的安全性 有人认为,抗昆虫农作物体内的蛋白酶活性抑制剂和残留的抗昆虫内毒素,可能对人体健康有害。他们认为,抗昆虫农作物体内的蛋白酶活性抑制剂和抗昆虫内毒素,既然能使咬食其叶片的昆虫的消化系统功能受到损害,那么谁又能担保其叶片、果实、种子不会对人畜产生类似的伤害呢?所以奥地利、卢森堡规定禁止进口转基因抗虫玉米。

3. 抗除草剂作物的安全性 随着基因改造的抗除草剂农作物的推广,可能导致除草剂的用量增加,从而导致除草剂在食品中残留量加大。应用抗除草剂转基因作物具有极大的经济和社会效益,但也存在一定的风险。就是抗除草剂转基因作物的“杂草化”,一是抗性作物自身的“杂草化”,包括抗性作物逃逸生成杂草和自生苗对下茬作物的危害。二是抗除草剂转基因作物的抗性基因“漂移”到杂草上,导致抗药性杂草产生。

抗除草剂转基因作物的抗性基因“漂移”到杂草上,导致抗性杂草的产生,增加防除难度。研究结果表明,有很多作物能和他们的近缘杂草杂交,从而使抗性基因转移到杂草上。所以如果种植转基因作物后,不进行适当的管理,只依赖除草剂来防除杂草,将会导致除草剂使用量的增加,从而加重食品和环境的污染,反而取得相反的效果。即使在培育抗除草剂作物时选用那些公认较安全的除草剂,长期大量施用它们,也会造成影响。

4. 引入病毒外壳蛋白基因的抗病毒农作物可能对人体健康产生危害 从目前看,尚无确凿的证据能证明转基因食品对人类健康有直接影响,但人们的担心依然存在。

(二) 对环境和生态的影响

1. 转基因作物本身可能变为杂草甚至导致超级杂草的产生 转基因作物本身可能变为杂草,并且如果转基因高产作物一旦通过花粉导入方式将高产基因传给周围杂草,会引发超级杂草出现,对天然森林造成基因污染,对这些地区的其他物种带来不可预见的后果。

2. 转入毒蛋白基因的作物的花粉可能有安全问题 转入毒蛋白基因的植物,如果毒蛋白能在花蜜中表达,则可能引起蜜蜂等传粉昆虫和植物群落的崩溃,甚至有可能危及其他动物以及人畜的栖居环境和身体健康。

3. 有可能污染人类的食品供应 如果用于食品的植物通过基因改良成为药用植物,那么通过异花授粉会使食用植物产生药性,从而污染人类的食品供应。

4. 有可能产生超级病毒或新病害 转基因作物可能产生新的超级病毒或新的病害。

5. 未来破坏环境的可能 作为人工制造的转基因作物,可能成为自然界不存在的外来品种,若干年后可能对环境造成破坏。

6. 会威胁生物多样性 转基因作物对非目标生物会有伤害,对生物多样性形成威胁。

7. 利益驱动有可能导致农业崩溃 遗传工程技术公司为了赢利,想办法用了一种“终止子”技术。如果转基因不育品种的不育基因在种植地大肆传播,会导致当地农业崩溃。美国 DPL (Delta and Pine Land) 公司和美国农业部联合申请该专利,并于 1998 年 3 月获得美国专利局的批准。该专利技术可使作物种植后得到的种子是不育的,虽然收获了种子,但不能留作种用。该项技术的大致程序是,用遗传工程的技术把终止子基因插入到作物中得到转基因作物的种子;种子公司在种子出售前再加上一种诱导剂,农民播种后长出正常的植株,收获成熟的种子。该种子在油脂、蛋白质等方面都是完全正常的,但不能当作种用,因为在诱导剂的作用下,加入的毒素基因启动产生了毒素,在种子成熟收获前就杀死了胚胎,因此这种种子不能发芽当生产用种。

“终止子技术”获得后引起国际上很大的反响。许多国家认为，由于外观上分不清终止子技术生产的种子，通过出售或交换不能发芽的种子，播种后可能会对生产造成不可弥补的损失，通过花粉非故意传播会造成不育基因在种植地大肆传播，会导致当地农业崩溃。为了保护世界食品，许多国家和组织纷纷要求禁止终止子技术。

（三）对贸易和政治的影响

对转基因作物和转基因食品，欧洲和美国是两大争论阵营，他们对转基因作物的态度截然不同，美国是竭力提倡，而欧盟则犹豫不决。1998年这两种态度终于发生了最激烈的碰撞，它使美国和欧盟之间终于产生了一场一触即发的贸易危机。当时的美国总统克林顿、国务卿奥尔布赖特等纷纷出面敦促欧盟调停这场争端，措辞强硬信函更是不断地发往欧盟总部，虽然当年的贸易对美国的经济影响不大，但对今后欧盟贸易的影响则是深远的，美国据理力争。最后，随着欧盟的妥协，才算告一段落。

转基因作物的贸易纷争实际是欧美贸易和政治关系的又一次对抗。欧美的经济和政治利益矛盾冲突已久，对转基因作物的争论已经远不是技术本身的一些争论。

第三节 转基因食品的安全性评价

随着转基因食品技术的不断成熟，转基因作物由实验室走向大田种植，不少作物走向商品化发展。但是对转基因食品的安全性争论仍然很激烈，转基因作物的生态风险、可能带来的环境问题、转基因产品作为食品对人体健康问题、产品加贴标签问题、运输问题、国际贸易问题、知识产权问题等已引起世界性的所谓“生物安全”的论战。拥护者以各种形式促进其更快地发展。反对者则以示威游行，甚至毁坏大田实验等各种行动来进行抵制。1999年1月在哥伦比亚召开的转基因食品安全国际研讨会上，各国代表矛盾尖锐，争论激烈，结果不欢而散。转基因产品的安全性问题实际上已由学术观点分歧，发展到知识产权、环境问题、经济问题甚至政治问题。但总的来说转基因产品的商品化是知识经济成功的一个范例。

作为农产品生产和出口大国，美国在生物技术的开发和应用上都走在世界前列。美国宣称转基因食品与传统的食品一样，是安全并且对人体无害。

欧盟等认为转基因食品应用于生产和消费的时间尚短，食品的安全性和可靠性都有待于进一步的研究和证明，转基因食品可能会导致一些遗传学或营养成分的非预期改变，可能会对人类健康产生危害。转基因食品对人类健康和环境的影响要经长期考察，有的甚至要在几十年之后才会显现出来，例如，农药 DDT 在研制生产的初期，是经过安全性试验证明对人类是无害的，但经过几十年后才发现 DDT 残留的危害，并且由于残留时间较长，很难在短期内解决。所以可以想像，转基因食品一旦对人类健康和环境平衡造成了破坏，恢复起来将非常困难，因此必须采取谨慎的态度。

一、转基因食品的安全问题

新的技术带来了社会、经济、环境和技术的效应，同时也带来了新的问题。

随着转基因技术作物（食品）的商品化生产，食品安全性越来越受到广泛的关注。传统的毒理学的食品安全性评价方法已经不能适用于转基因技术食品。1990年召开的第一届FAO/WHO联合专家咨询会议在安全性评估方面迈出了第一步。会议讨论了来源于动物、植物和微生物的各类食品。对每一类食品，考虑了在进行生物技术食品安全性评价时的一般性和特殊性问题。最后，会议提出了生物技术添加剂和食品的安全评价策略，建议安全评价应基于被评价食品和（或）食品成分的分子、生物和化学的特征，并基于以上方面的考虑来决定对该食品进行传统毒理评价的必要性和范围。会议明确阐述了“转基因食品及食品成分的安全性评价策略是基于产品被加工过程的充分了解，以及产品本身的详细特征描述”。对于有关毒理学评价方面，会议认为“经典毒理实验在整个食品的安全性评价方面可以有限度地应用……即使对于一直使用这些评价程序的食品，也有必要重新回顾，以期开发出更新的安全性评价途径”。1990年经合组织(OECD)提出了食品安全性分析的原则——实质等同性(substantial equivalence)原则。1996年第二届FAO/WHO联合咨询会议重申了1990年的咨询会议的总建议，强调建议全面完善的食品法规对于保护人类健康是至关重要的。目前，各国及国际机构均在积极制定相应的条例，以便在促进生物技术发展的同时，保障环境安全及人类健康。

人们对转基因食品的担忧基本上可以分为3种，一是新加入的基因在无意中对消费者造成健康威胁；二是新基因给食物链其他环节造成无意的不良后果；三是人为强化转基因作物的生存竞争性，对自然界生物多样性的影响。其中转基因食品对人类的健康问题是最被关注的问题，这样就需要对其主要的营养成分、微量营养成分、抗营养因子的变化、有无毒性物质、有无过敏蛋白以及转入基因的稳定性 and 插入突变等进行检测，重点是检测其特定差异。另一个问题是对转基因产品的标记基因的安全性评价，虽然国际上认为大部分使用的标记基因是安全的，但有些基因的安全性仍不能肯定。可安全使用的标记基因，仅指基因本身，并不包括启动子、终止子、基因的多效性及其他多种可能的次生效应。次生效应可因插入位点不同而异，而迄今为止，人类尚无法预测基因的插入位点，也不能做到基因准确的定点整合。所以，标记基因的安全也是转基因食品安全性评价的一个重要方面。

二、转基因食品的安全性要求

IFBC（国际食品生物技术委员会）与WHO/FAO专家评议会认为，用传统生物技术（杂交、培育、突变）生产的食品一般是安全的。现在人们担忧的问题是用基因工程技术（如用DNA重组技术）生产食品的安全性。基因工程技术生产的食品不论是用微生物生产的食品，还是植物性或是动物性食品，其安全性都应从宿主、载体、插入基因、重组DNA、基因表达产物和对食品营养成分的影响几方面来考虑。具体的要求有：

①对提供目的基因的供体和接受基因改造的受体，必须明确其在生物学上的分类和基因型及表型。

②进行基因改造用的基因材料（包括目的基因和载体）的片段大小和序列必须清楚，不能编码任何有害物质。

③避免基因改造食品携带的抗抗生素基因在人体胃肠道向病原微生物转化使之产生耐药

性。所以要求对载体进行改造，尽量减少载体向其他微生物转化的可能性。对于基因改造后含活微生物的食品，微生物不能携带含抗抗生素基因。对于携带含该抗抗生素基因的微生物所产生的食品成分，它不能含有该活微生物和编码抗抗生素的遗传材料。对于转基因植物性食品，虽然由启动子控制的抗性基因转化到微生物中表达的可能性很小，但也不排除在某些条件下表达的可能性。所以要对这些条件加以研究，限制一些不是很明确的抗性基因在植物性食品中的应用。

④引入外源基因的重组 DNA 要稳定，即外源基因的插入不能导致宿主内某些功能基因的失活和某些基因的激活，从而导致一些毒性物质的产生。基因改造后的生物体不应含有任何有害物质。

⑤生物改造食品若含有活的基因改造微生物，该微生物在体内的增殖不应对体内肠道正常菌群有任何不利的影响。

⑥含致敏源的基因改造食品，必须加以标明后方可进入市场。对含潜在过敏源的新蛋白质基因的转基因食品，相关机构必须进行对人体进行健康监测。转基因表达产物对该食品的营养成分和生物利用率不应有负面影响。

⑦对转基因微生物、动物和植物性食品，要建立一个包括其分子特性、营养成分、毒素及其结构、过敏成分及其氨基酸序列等的数据库，可以很方便地从中获取资料并与传统食品进行比较。

三、转基因食品安全性评价的目的

以重组 DNA 技术为代表的现代生物技术（特别是基因工程技术）在为人类生活和社会进步带来巨大利益的同时，有时也有可能对人类健康和环境安全造成不必要的负面影响，所以世界各国高度重视生物安全的管理，尤其是对转基因食品的管理，包括安全性的研究、评价、检测和控制措施等技术内容。其中，安全性评价是安全管理的核心和基础，主要目的是从技术上分析生物技术及其产品的潜在危险，确定安全等级，制定防范措施，防止潜在危害，也就是对生物技术研究、开发、商品化生产和应用的各个环节的安全性进行评价，以期有关安全管理提供决策依据，使其在保障人类健康和生态环境安全的同时，也有助于促进生物技术的健康、有序和可持续发展，达到兴利避害的目的。

（一）提供科学决策的依据

对转基因食品进行安全性管理和科学决策的基础是对转基因食品进行安全性评价。虽然对于安全性的理解和要求，可能因人、因国而异，但需要对每一项具体工作的安全性或危险性进行科学、客观的评价，划分安全等级。安全性评价的结果是制定必要的安全监测和控制措施的工作基础，又是决定该转基因食品能否投放市场或者进行商品化生产的主要科学依据。

（二）保障人类健康和环境安全

安全性评价是保障人类健康和环境安全的需要。通过安全性评价，可以明确该转基因食品是否存在危险、存在哪些危险及危险程度，从而可以有针对性地采取相应的措施控制食品原料或者加工过程中的一些操作技术问题，避免或减少其对人类和环境造成的危害。

（三）回答公众疑问

安全性评价是回答公众有关转基因食品安全性的需要，由于现代生物技术对基因操作的强大能力和人类目前对自然的认识能力水平有限的现实，社会对生物技术及其产品的高度关注和种种疑虑是必然的，也是可以理解的。对于有关的生物技术，尤其是对转基因产品向自然环境释放和生产应用进行科学、合理的安全性评价，有利于消除公众因缺乏全面了解而产生的种种误解，形成对生物技术安全性的正确认识，既不对转基因食品一概地拒绝，也不是对它不予理会或完全没有安全意识。

（四）促进国际贸易，维护国家权益

进行安全性评价是促进国际贸易和维护国家权益的需要，随着全球经济一体化的发展，国际贸易日益发达，国际竞争日趋激烈，这一点在 21 世纪的生物技术产业可能会表现得极为突出。转基因技术及转基因食品的安全水平与其操作技术、操作方法和其所处的环境具有极其密切的关系，在一个国家认为比较安全的转基因食品，在另一个国家就可能是不安全甚至是十分危险的。所以，对于进出口转基因食品和加工的转基因食品原料的安全性评价和检测水平，不仅关系到国际贸易的正常发展和国际竞争力，而且还关系到国家的形象和权益。

（五）促进生物技术可持续发展

进行安全性评价是保证和促进生物技术和其产品的稳定、可持续发展的需要。转基因食品的安全性问题关系着人类安全、健康和自然环境，是自现代食品生物技术兴起以来一直受世界关注和争论的焦点，曾经引起一些国际风波。随着转基因食品在世界各地的农业、食品、保健食品和医药行业的产业化进程的飞速发展及其体现出来的巨大应用前景，其安全性问题日益紧迫。由于不了解或其他原因，一些团体和个人组织的反对生物技术，反对转基因食品的抗议和破坏活动在一些国家时有发生，很不利于转基因技术及转基因食品的健康发展。通过对转基因的安全性评价，科学、合理、公正地认识生物技术的安全性问题，及时地采取适当的措施对其可能产生的不利影响进行防范和控制，这样转基因食品对人类健康和生态环境的潜在危险就可以避免或者降低到可接受程度。只有这样，转基因食品才能逐渐被世界普遍接受，转基因食品的产业化才能走上健康、有序、持续发展的道路。

四、转基因食品安全性评价的原则

（一）IFBC 提出的评价原则

IFBC 于 1988 年提出用判定树（decision-tree）的原则与方法对转基因食品进行安全性评价。IFBC 制定的判定树原则包括三个层次：①了解被评价食品的遗传学背景和基因改造方法；②检测食品可能存在的毒素；③进行毒理学试验。

但是没有必要对三个层次都进行工作，一旦在某个层次上得到了满意的答案，便无须再进入下一个层次的工作。

（二）WHO 和 FAD 联合提出的评价原则

WHO 和 FAO 联合专家评议会制定的生物技术食品的安全性评价政策与原则着重强调：

①安全性评价应以科学为依据，慎重与灵活相结合。考虑适用性，适应生物技术的发展，不

能高估转基因食品的安全性，也不能低估转基因食品的安全性。

②任何生物技术食品的安全性评价应首先阐明其分子、生物学和化学特性。分子特性是对基因改造生物体过程中所运用的技术进行详细阐述，包括目的基因和载体的成分与特性，以及载体向宿主转化的方法等。生物学特性主要是明确目的基因的供体和宿主的分类、基因型及表型，了解其产生毒素的特点、致病力与感染性。化学特性就是对基因表达产物进行化学结构分析。采用以分子、生物学和化学分析数据为依据，与传统食品相比较的原则，按个案决定所需的毒理试验的项目和范围分析。若分子、生物学和化学分析表明该食品与传统的且其安全性已被广泛接受的某种食品相似，就不需要进行毒理学实验。而对没有安全使用历史的转基因食品，就需要进行广泛的毒理学评价，如果必要的话还需要进行志愿者试验，尤其是转基因食品的营养和致敏性试验。

③转基因微生物产生的食品，若分子、生物学和化学分析表明与传统食品相一致，则主要是对其杂质和加工方法进行评价，强调在加工过程中实施关键控制点危害分析（HACCP）与良好的生产规范。

④对于转基因动物性食品，哺乳类动物本身的健康也可作为安全性评价的标志，因为转入外源基因的负效应可在动物本身的生长发育障碍和繁殖能力下降得以反映。当然有些鱼类和无脊椎动物自身可产生毒素，需要做进一步的评价。

⑤对已进行安全性评价的食品，并且已被批准使用的，要进行有计划的人群摄入后的健康检测。

五、转基因食品安全性评价的方法

（一）实质等同性原则

为促进制定转基因食品安全性评价的国际条例和国际贸易，1990年联合国粮农组织（FAO）与世界卫生组织（WHO）联合召开了“食品安全性与生物技术的专家咨询会议”，并于1991年出版了咨询报告《生物技术食品安全性分析的策略》（WHO，1991）。1992年美国的FDA公布了转基因植物作为食品的政策，政策规定，来自重组DNA技术的植物新产品及其产品，不需要由FDA作市场前评价和批准，除非它引起新的安全性问题。经济发展合作组织（OECD）1993提出了“现代生物技术食品安全性评价：概念和原则”的报告，报告引入了实质等同性（substantial equivalence）的概念。WHO于1995年将实质等同性原则应用于现代生物技术产生的植物性食品的安全性评价。实质等同性即基因工程食品及成分是否与目前市场上销售的食品具有实质等同性，这是转基因食品安全性评价的最为实际的途径。其概念是：如果某种转基因食品或食品成分与已经存在的某一食品或成分在实质上相同，那么在安全性方面，前者可以与后者等同处理（即新食品与传统食品同样安全）。

实质等同性本身不是危险性分析，是对转基因食品与传统市售食品的相对安全性比较。它是一种动态的过程，既可以是很简单的比较，也可能需要很长时间，这完全取决于已有经验和食品及食品成分的性质。

实质等同性分析可在食品或食品成分水平上进行，这种分析应尽可能以物种（如大豆单独作

为一个物种)作为单位来比较,以灵活地用于同一物种生产的各类食品。分析时应考虑该物种及其传统产品的自然变异范围。分析的内容包括GMO的分子生物学特征、表现特征、主要营养素、抗营养因子、毒性物质和过敏原等。进行实质等同性比较所需的数据可以来自现有的数据库、科学文献、父代或其他传统亲缘种系积累的数据。

实质等同性比较的主要内容:对植物来说包括形态、生长、产量、抗病性及其他有关农艺性状;对微生物来说,包括分类学特征(如培养方法、生物型、生理特性等)、定殖潜力或侵染性、寄主范围、有无质粒、抗生素抗性、毒性;对动物来说包括形态、生长生理特征、繁殖、健康特征及产量。

对食品成分的比较内容有:主要营养素(脂肪、蛋白质、碳水化合物、矿物质、维生素)及抗营养因子(如豆科作物中的蛋白酶抑制剂、脂肪氧化酶)、毒素(如马铃薯中的茄碱、番茄中的 α -番茄素、小麦中的硒等的含量有否增加)和过敏原(例如巴西坚果中的2S清蛋白)。

(二) 等同与相似原则

科学会欧洲分会新食品领导小组提出采用等同与相似原则来评价食品的安全性(safety assessment of food by equivalence and similarity targeting, SAFEST),对用基因工程技术生产的食品要从营养和毒理学两方面按个案进行评价。在评价一种食品的安全性时,应首先了解其背景资料,包括食品名称、来源(动物、植物还是微生物)、基因改造方法(宿主、载体、插入基因、重组生物体的特性)、人体摄入量、使用目的及使用人群(是否是特殊人群,如儿童、孕妇等)、加工方法及食品成分等。同时确定待评价的实验样品与实际生产的和人类实际消费的食品是否一样。用实质等同性的概念将植物、动物、微生物基因工程食品归为三类:①转基因食品或食品成分实质上完全等同于现有的食物;②除了某些特定的差异,与现有食品及成分具有实质等同性;③某一食品没有比较的基础,即与现有食品没有实质等同性。

1. 对第1类食品的评价 对成分单一,生物化学特性清楚的食品,相同与相似系指,与传统的安全食品相比,两者的生物化学特性一致,差异仅在传统食品自然变异范围之内。对成分复杂的复合食品,相同与相似是指食品成分、营养价值、体内代谢途径、膳食中的作用、杂质水平在已知食品的变异范围之内,就不需要进行进一步的营养和毒理学评价。两者应等同看待。

2. 第2类食品的评价 第2类食品与传统食品极为相似,但存在某个新成分和新特性,或缺乏某个成分与特性的基因改造食品,其不同成分与特性应作为进一步分析和评价的靶点。这两种食品确定的差异包括:引入的遗传物质是编码一种蛋白质还是多种蛋白质,是否产生其他物质;是否改变内源成分或产生新的化合物。引入DNA和信使RNA(mRNA)本身不会有安全性问题,因为所有生物体的DNA都是由四种碱基组合而成的。但对应引入的基因的稳定性及发生基因转移的可能性做必要的分析。

新食品的安全性评价应主要考虑基因产物及功能,即蛋白的结构、功能和特异性及食用历史。这些应在前期进行,然后决定是否需要以及采用何种安全性评价方法来确定蛋白质的安全性。通常蛋白质不会引起大的安全性问题,因为人类饮食中含有大量的蛋白质组分,如典型的真核细胞含有数以万计的不同蛋白质。并且遗传多样性、基因的多个等位点以及翻译后加工(糖基化或甲基化)同时也导致了食用蛋白的多样性。一般来说,已食用的蛋白质或其功能上与可安全食用的已知蛋白功能类似的蛋白质(包括某些小的结构或其功能的变化)不会引起安全性问题。

但若蛋白的功能不同,则要做潜在毒性和过敏性分析。对于蛋白质产物的安全性和由其产生的其他物质,包括脂肪、碳水化合物、小分子化合物(内源组分的改变或新组分的产生)的安全性应该加以注意。

目前已知有少数蛋白对脊椎动物有毒性,这些蛋白的特性多数已经明确。了解引入基因(蛋白)的来源、序列及其功能,便可明确其蛋白质的安全性。若基因来源于对哺乳动物有毒、可产生毒蛋白的生物,或者引入蛋白与已知哺乳动物毒素蛋白在氨基酸序列上有明显的同源性,则应进行急性毒性试验或其他体外、体内试验。同样,若基因来自于已知的过敏食物原,则应防止过敏原的转移。

若某种蛋白功能上与内源蛋白相同或类似,则不可能引起明显的安全性问题。如来自苏云金杆菌(简称 Bt 菌)的杀虫晶体蛋白,因为它特异地作用于靶昆虫,对哺乳动物、鱼类和非靶昆虫无害,故就其而言,重要的是其特异性和作用模式。体外试验证明这种杀虫蛋白能特异地与靶昆虫的肠细胞结合,而在哺乳动物组织中无结合点。因此根据 Bt 蛋白的结构、功能、特异性及消化降解等特点并不要求对其做动物急性毒性试验。

一般来讲,人们对通过基因修饰引入食品中的蛋白质已经了解得比较清楚,并且已知它不会对脊椎动物产生毒性作用。若在研究过程中该蛋白不表现出异常的功能,一般不需要做进一步的安全性测试。若通过证实与已知蛋白质毒素、过敏原不具有类似的氨基酸顺序,可在模拟哺乳动物胃肠环境下进行蛋白质快速水解来测定水解速率。若蛋白不能被很快降解,则应考虑进一步的检验如急性毒性试验、过敏检测等。

对有些蛋白质或加工后的食品,依据其蛋白质或食品产品的功能可能需要谨慎考虑。如,某些蛋白质是抗营养因子(如凝集素和蛋白酶抑制剂),因此含这类毒素物质的食品生吃时会产生毒害。但由于加工过程可减少或消除一些毒性物质,在加工后的食品是安全的。

蛋白若具有酶功能,则可产生碳水化合物、脂肪、油或小分子化合物。对碳水化合物来说,主要是淀粉的改造,如直链淀粉和支链淀粉的含量以及支链淀粉的分支性。这种修饰的淀粉可能在功能和生理上与食物通常存在的淀粉一样,不会引起任何特殊的安全性问题。但若果蔬中产生了高浓度的这种不易消化的碳水化合物(正常情况下果蔬中很低),或者经修饰后可将易消化的碳水化合物转成不易消化的形式,则应对其营养和生物功能做进一步的分析。若脂肪和油类的成分和结构改变,则可能导致明显的营养改变或显著改变其消化性,这就有必要特别表示产物,以反映其结构中的新组分。再次,对于链长大于 22 个碳的脂肪酸、有环状取代基的脂肪酸、脂肪酸中存在原来脂肪和油类中没有的功能基团、已知有毒性的脂肪酸(如芥子酸)等,一般应考虑其安全性。在对食品中新成分的实质等同性比较的工作中,若存在对照食品,可参照现有食品中的同一成分来进行。

基因可以引入到生物体中编码一种或多种蛋白质,在受体生物中产生一种新的或修饰的小分子组分。这些产物的安全性评价应该考虑产物的信息、特征、其他食物中相同或类似产物的安全食用历史等。在某些情况下还需要做进一步的测试,包括适当的体内、体外试验。具体做法则根据产物的特异性程度、对其功能了解的多少、与食品中现有物质的相似程度等来决定。

3. 对第 3 类食品的评价 第 3 类食品没有与相应或类似的食物作为比较,例如将来有可能将基因组区段转入某一生物而该基因组区段的功能可能仅经部分鉴定,那么评估该转基因食品或

食品成分就应根据其自身的成分和特性研究来进行，并需要进一步做广泛的毒理学评价。

第3类食品中，若某种食品或食品成分与现有食品成分无实质等同性，这并不意味着它一定不安全，但必须考虑这种食物的安全性和营养性。首先应该分析受体生物、遗传操作和插入DNA、遗传工程体(GMO)及其产物特性如表型、化学和营养成分等。若插入的是功能不很清楚的基因组区段，同时应考虑供体生物的背景资料。

考虑到转基因食品的种种特殊性，对食品的安全性分析应采取个案分析处理，依据初步鉴定积累的资料，决定是否需要同步采用体外和特异的体内动物试验。从营养角度考虑，可能需要做人体试验，尤其是当新食品取代传统食品并作为膳食中的主要食品时。人体试验要在动物试验证明无毒后才能进行，还应考虑人群中有无敏感人群及各国各地区食物等的差异。

六、转基因食品安全性评价的几个问题

(一) 毒性

许多生物食品本身就能产生大量的毒性物质和抗营养因子(如蛋白酶抑制剂、溶血剂、神经毒素等)以抵抗病原菌和害虫的侵入。如大多数谷类食品含有蛋白酶抑制因子，许多豆类含相对较高水平的凝集素和生氰糖苷。植物凝集素若食用前未被加热或浸泡除去，能导致严重的恶心、呕吐和腹泻。生食木薯和一些豆类，其生氰糖苷含量能导致慢性神经疾病甚至死亡。

蛋白酶抑制剂(proteinase inhibitor, PI)是一类自然界中含量最丰富的蛋白种类，存在于所有的生命体中。在植物的大多数储藏器官中(如种子和块茎中)，各类蛋白酶抑制剂含量可达总蛋白的1%~10%，有些可达30%。蛋白酶抑制剂在植物内的功能主要有两个方面：一是与蛋白酶相互作用，相互制约控制生物体内细胞、组织和体液中有关的生理过程；二是防止细胞、组织及体液中的蛋白成分被外源蛋白酶降解。蛋白酶抑制剂能与外源蛋白消化酶相互作用，形成酶-抑制剂复合物(EI)，阻断或减弱消化酶的蛋白酶的水解蛋白作用。一旦摄入蛋白酶抑制剂，会影响外来蛋白的正常消化。同时，蛋白酶抑制剂和消化酶形成的EI复合物，能刺激消化酶的过量分泌，通过神经系统的反馈，使生物体产生厌食反应，最终造成死亡，或者不正常发育。蛋白酶抑制剂以其广谱抗性的特点，越来越受到人们的重视。目前已经有多种蛋白酶抑制剂基因或cDNA被克隆，最引人注目的是豇豆胰蛋白酶抑制剂(CpTI)基因。

现有食品中许多毒素含量并不一定会引起毒效应，当然如果食品处理不当，某些食品(如木薯和一些豆类)能引起严重的生理问题甚至死亡。评价的原则应该是：转基因食品不应含比其他同种可食用物质更高的毒素含量。生物体在进化过程中往往会产生因突变而不再发挥作用的代谢途径——沉默途径(silent pathway)，其产物或中间产物可能含有毒素。在通常情况下，这类途径很少发生变异、染色体重组或被新调控区所激活现象，尤其是在具有长期安全食用历史的食品作物中。但在转基因变种中，沉默途径有可能被激活，低水平的毒素可能在新变种中被高含量表达，以前未产生的毒素也有可能因此产生。

任何基因转入的方法都可能导致GMO产生不可预知的或意外的变化，包括多向效应。靠设计一个试验来鉴别这些效应是不可能的。对于转基因食品，首先应判断其与现有食品有无实质等同性，对关键营养素、毒素和其他成分进行比较。如果受体生物有潜在的毒性，还应检测其毒素

成分有无变化,插入基因是否导致了毒素含量的变化或产生了新的毒素。对新食品及产品与现有食品、成分的化学组分的比较,可更好地对潜在效应进行估计。目前可考虑的检测方法包括 mRNA 分析、基因毒性和细胞毒性分析。

当生理生化分析方法不能解决基因修饰带来的安全性问题时,可以进一步做安全性评估。使用的方法可以采用动物喂饲或其他毒性测试。因为动物喂饲实验有很多不足之处,所以必须根据评价目的来设计。我们认为,应该改进动物实验方法,以适应对新的转基因食品的安全性评价需要。将来的研究应侧重于对某些特定的毒理学临界点敏感参数的识别,例如转基因食品检测的免疫毒性、神经毒性、致癌性与遗传毒性、多种模型动物的建立等。应当指出,对 GMO 毒性的评价还应当考虑其环境生态效应。模型动物的选择应有广泛的代表性,不应该仅限于哺乳动物。

一般而言,蛋白质不会成为明显的安全性问题,因为在人类食物中包括了各种各样的蛋白质。若基因来源于一种可产生哺乳动物毒素蛋白的生物,或者引入的蛋白与已知的哺乳动物毒素蛋白在氨基酸序列上有明显的同源性,则应进行急性毒性试验或其他体外、体内试验。

有些蛋白质已知为营养拮抗物(如外源凝集素和蛋白酶抑制剂),由于食品加工中可减少或消除这些毒性物质,适当加工后是安全的。除了蛋白质以外,其他一些物质,如脂肪酸的成分或结构改变,可能导致明显的营养后果或显著改变其消化性,需要注意分析。

转基因食品的安全性评价包括了营养学和毒理学评价两个方面。

1. 营养学评价 若根据基本资料不能确定新型食品与传统食品相同或相似,则必须对其进行进一步的营养评价,对第 2 类食品,应该着重于比较传统食品与基因改造食品的不同点。必要时,对于某一特殊的基因改造食品,在动物实验确定对人体健康无害时,再进行志愿者实验以确定营养研究的结果。对基因改造食品的营养评价应从营养价值、营养素的生物利用率和对营养素的摄入量的影响这三方面进行。对转基因食品的营养价值的评价包含三个要素:组成成分、在膳食中的作用(是否补充了某种营养素)和在膳食中的应用情况,结合人体的膳食摄入情况对其营养价值进行评价。对在膳食中的作用是补充营养的食品就需要对营养素的营养利用率进行研究。如果该食品的摄入使得某个营养素超过 RDA 的 15%,就需要对该基因改造食品中该营养素的数量、生物利用量与摄入量重新考虑。

2. 毒理学评价 某一新型食品或原料不足以证明与传统食品具有等同性时,就需要进一步的毒理学资料。要求补充一些毒理学实验需要根据新食品的来源、组成、可能摄入量及适用人群。对于第 3 类食品需要进行广泛的毒理学实验来评价。对于第 2 类食品,主要集中于传统食品比较的不同点。某些情况下,可选用从基因食品中分离的与传统食品不同的单一成分进行实验,而不用比较整个食品是否合适。但是对结果的解释要谨慎,因为是往往单一成分有毒性而整个食品却没有毒性,这样可增加评价的安全性。如果该成分不易或者不可能从食品中分离出来,就需要对整个食品进行评价。

对于毒理学评价,国内外的评价方法之间存在着一定的差异。

欧洲新食品领导小组建议的对这类食品的毒理学评价实验项目包括:毒物动力学和代谢试验、遗传毒性、致过敏性、增殖性、致病性、啮齿类动物 90d 亚慢性喂养试验及其他毒性试验(根据化学结构分类、人体接触水平决定是否进行繁殖试验和致癌试验等)。此外还需要考虑人体

试验,包括人体对该食品的耐受水平、对人肠道正常菌群和生物学指标的影响研究。下面几个方面仅供选择时参考,但是总的原则还是根据个案处理。

(1) 毒物动力学。对新型食品或原料中特定的化学物质可能需要做毒物动力学研究。如第2类新型食品中通常有化学物质与相似的传统食品之间有差别。研究内容通常包括吸收、分布、代谢及排泄。

(2) 遗传毒性。包括体外试验和体内致突变实验。

(3) 潜在致敏性。致敏性试验主要是为了检测出引起过敏反应的蛋白质。目前对新蛋白质还没有可靠的预测性试验。可以从经证实对可疑食品过敏的病人取血清进行 Western 印迹试验,如果是阳性结果就需要做人体皮肤刺激试验来确定是否含有致敏成分,然后在控制的临床条件下以双盲法对可疑过敏人群进行食品过敏试验。上述三种试验中有一个阳性的就要考虑在食品标签上表明可能有可疑致敏蛋白质。如果新型食品或原料的历史并不能提供有过敏关联的蛋白质来源,就需要采取另外的方法策略。一旦检测出有新蛋白质存在,就要与已知过敏原进行一系列的比较试验:分子量、血浆中的浓度、热稳定性、加工过程中是否稳定、受 pH 影响、受胃肠蛋白酶消化性、氨基酸序列、在食品中占的比例。对新型食品的潜在致敏性要进行严格的上市前试验和上市后对食用人群的监测。食品生产工人通过吸入、皮肤接触也可能发生过敏反应。

(4) 基因遗传与稳定性。在转基因食品作物中应用抗生素抗性标记基因,人类食用了含有这种基因的食品后会不会发生标记基因在人肠道或反刍动物瘤胃中向微生物转移、保留、表达?这在理论上是有可能的。最好不用对抗生素有抗性的标记基因,不能随便使用基因。若能确定这种基因在消化道中能被消化酶很快地降解,危险性将不是很大。美国转基因玉米中含有 β -内酰胺酶基因,它可能从玉米转移给牲畜反刍瘤胃或消化道中的细菌,使接受 β -内酰胺抗生素治疗的病人可能面临着一定的难度和风险,因为在肠道内产生了具有抗药性细菌。而欧盟食品和动物科学营养委员会认为产生抗药菌的可能性很小,没有临床意义。

(5) 微生物定植。本身是活菌或者含有活菌的新食品需要测定这项指标。微生物定植能力通过检测粪便中微生物含量与吃传统食品时的含量来比较。要对已经有特定的微生物或人肠道微生物菌群定植的啮齿类动物或无菌动物进行稳定性和亚急性性试验与评价,以便设计进一步的毒理学试验。

(6) 微生物致病性。本身是活菌或含有活菌的新食品需要进行致病性试验,并且在生产中要保持菌不发生突变产毒,防止污染。

(7) 啮齿类 90d 喂养试验。新型食品中的微量成分采用食品添加剂的传统试验,观察遗传毒性、神经毒性、免疫毒性及生长繁殖毒性。含大量新成分的新食品中以传统的 ADI 加上安全系数法不可能进行,因为动物喂食了过量营养成分后会引引起营养不平衡而掩盖了真正的毒性,建议使用恰当的生物学标志,能早期指示特异效应而且以后做人群试验研究时有用的标志物为最好。用动物试验研究新食品的加工工艺时,最好用人类膳食代替传统的动物饲料。

(8) 验证对人类的安全性。包括耐受量、对肠道菌群谱和数量的作用以及对生物标记的效应,新食品或原料上市后,要探讨在消费者中产生不良反应的原因。到一定时间后要要进行新食品的安全性再评价,这可借鉴药品再评价的经验。

我国对转基因食品安全性的毒理学评价方法如表 8-1 所示。

表 8-1 食品安全性毒理学评价程序与方法

第一阶段试验

急性毒性实验

第二阶段试验

1. 动物遗传实验

(1) Ames 试验；(2) 小鼠骨髓微核率或骨髓细胞染色体畸变分析；(3) 小鼠精子畸形分析和睾丸染色体畸变分析；(4) V_{79} HGPRT 基因突变试验；(5) 显形致死试验；(6) 果蝇伴性致死试验；(7) 程序外 DNA 修复合成实验。

2. 传统致畸试验

330d 短期喂养试验

第三阶段试验

1. 190d 喂养试验

2. 繁殖试验

3. 代谢试验

第四阶段试验

慢性毒性试验 (包括致癌实验)

资料来源：《食品安全性毒理学评价程序与方法》法规，1983 年由卫生部颁布，1985 年修订。

(二) 过敏

过敏是一个全世界关注的公共卫生问题。有资料表明有近 2% 的成人和 4%~6% 的儿童患有食物过敏。食物过敏是指对食物中存在的抗原分子的不良免疫介导反应。过敏反应是免疫球蛋白 E (IgE) 与过敏原的相互作用引起的。在儿童和成人中，90% 以上的过敏反应是由八种或八类食物引起的。这些食物包括：蛋、鱼、贝类、奶、花生、大豆、坚果和小麦。所有的过敏原都是蛋白质。尽管食物中含有多种蛋白质，但只有几种蛋白质是过敏原，并且只对某些人过敏。

目前通过使用欧洲分子生物信息学网基因序列库 EMBL、蛋白序列库 SWISSPORT，根据对过敏性物质的蛋白质和 DNA 序列的查询分类，目前共发现过敏性物质 93 种。大多已知的食物过敏原已经可以在分子水平上被克隆和定性。

过敏反应常在摄入后几分钟和几小时内发生。极敏感的人对微量的过敏食物就有反应，个别人在摄入大量过敏食物后甚至可以有终生反应。

通常，食物过敏原具有如下共同的特点：①过敏原为具有酸性等电点 (PI) 的蛋白质或糖蛋白，一般分子量为 10 000~80 000；②它们通常能耐受食品加工、加热和烹调操作；③能抵抗肠道消化酶的作用。值得指出的是，这些特点并不是过敏原所特有的，因为非过敏原分子同样可以具有这些特性。

过敏蛋白受环境因素如气候和疾病逆境的影响，如北美和西欧人群中对花生的过敏率很高，但在其他食用花生少的国家无此现象。由于食品进口和出口的增加，近几年已经认为进口食品是食品过敏的新来源，所以改变膳食结构在引起过敏反应中有重要作用。

在下列情况下转基因植物食品中可能产生过敏性：①所转基因编码已知的过敏蛋白；②基因源含有过敏蛋白，如 Nebraska 大学证明，巴西坚果 2S 清蛋白的大豆有过敏性，这是迄今为止已知转基因作物未被批准商品化生产的惟一例子；③转入蛋白与已知过敏蛋白的氨基酸序列在免疫学上有明显的同源性；④转入的蛋白属某类蛋白的成员，而这蛋白家族中的某些成员是过敏蛋

白。目前已有一系列方法分析食品的潜在过敏性，并且同时建立可靠的动物模型来分析蛋白的过敏性。

对过敏反应的安全性评价程序，首先应了解被转移的基因来源特征。若该基因已经有过敏史，则评价比较容易。安全性评价最大的问题是对那些没有过敏史来源的基因进行试验，因为在理论上不可能得到可测试这些过敏原的来自过敏者的血清。目前可以考虑的方法是将蛋白质的氨基酸序列是已知的蛋白质的氨基酸序列分析结果按前面所描述的方法，与已知的过敏原进行比较，198种主要过敏原的氨基酸序列是已知的，若发现与某种过敏原有显著的序列相似性（至少有8个连续相同的氨基酸），则提示可按上面所描述的免疫化学方法用血清筛选。如果未发现氨基酸序列的相似性，则可进行蛋白质对酶消化及加工过程的稳定性评价。如果其分子是易消化和不稳定的，此产品进入市场是没有问题的，因为对消化不稳定的蛋白质不大可能是过敏原。如果该分子在消化和加工过程中是稳定的，就要进行进一步的研究分析。

若编码一种蛋白质的基因来自于已知的过敏原或其蛋白氨基酸序列分析结果显示其有过敏的可能性，并且其编码蛋白在遗传工程体的使用部分表达，则需要对此进行检测，以确定该基因是否编码某种过敏原。

Lehrer 等人提出，判断一种新的重组蛋白是否有致敏活性，大致可通过如图 8-1 所示的程序进行分析。

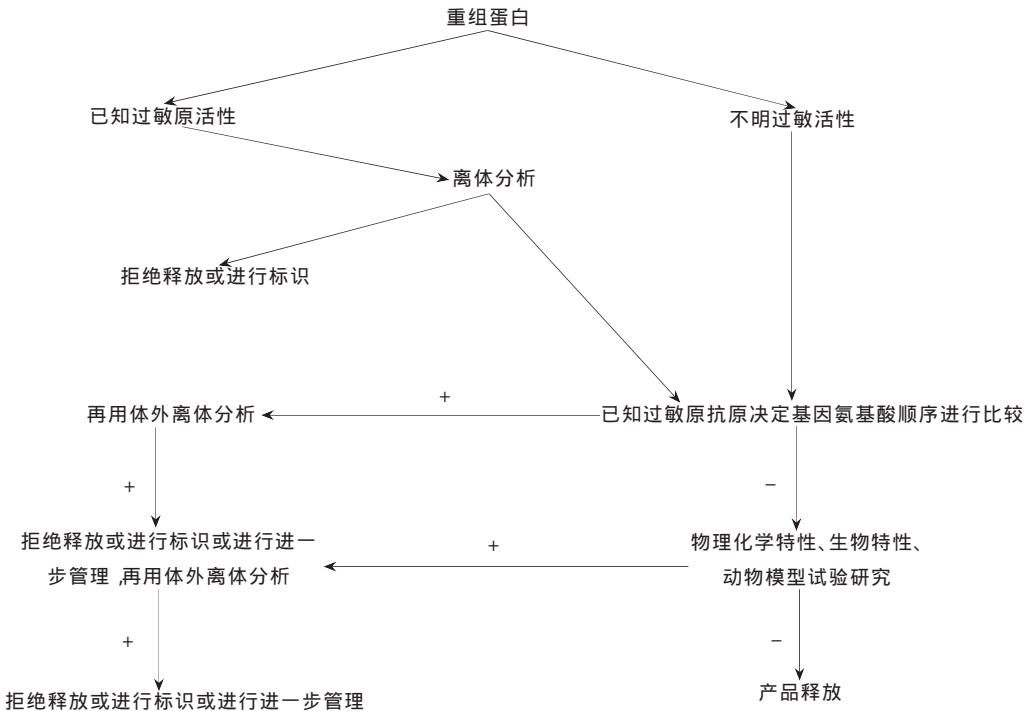


图 8-1 重组蛋白的致敏性分析步骤

国际食品生物技术委员会与国际生命科学研究院的过敏性和免疫研究所一起制定出一套分析遗传改良食品过敏性的树状分析方法，该树状分析方法已用于分析食品过敏性。Monsanto 公司用该方法评估抗原甘磷大豆的潜在过敏性，结果发现转入大豆的 EPSPS 酶与已知过敏原无明显的序列同源性，在模拟的哺乳动物消化系统中该酶很快被消化降解。

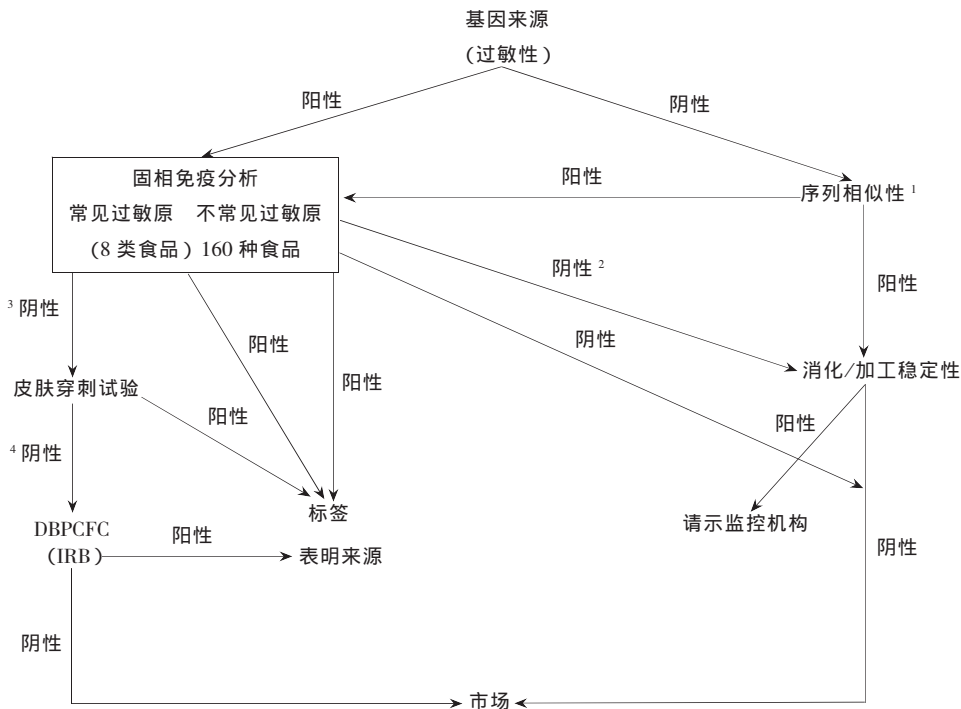


图 8-2 食品过敏性的树状分析法

1. 与所有已知过敏原比较氨基酸序列的相似性，分析所有基因产物对消化的稳定性 2. 固相免疫分析取决于能用多少种血清。理想的是必须用 14 种血清，若所用的血清少于 5 种，分析结果为阴性，则进行消化/加工稳定性测试，结果为阳性时请示相应的监管机构 3. 若结果模棱两可或怀疑为假阴性，则进入皮试 4. 根据固相免疫分析和皮试结果，若没有证据证明有过敏性，则进行食品的 DBPCFC 试验（DBPCFC 表示双盲、以安慰剂作对照的食物试验。为保证没有过敏性，DBPCFC 试验必须经 IRB 批准）

（引自贾士荣）

（三）标记基因的安全性

1. 标记基因的安全性 转基因食品安全性评价的另一个问题是标记基因的安全性评价。标记基因（包括选择标记基因和报告基因）用于植物遗传转化中帮助筛选和鉴定转化的细胞、组织和再生菌株。在选择压力下，不含标记基因及其产物的非转化细胞和组织死亡，含标记基因的转化细胞由于有抗性，能继续成活、分裂并分化成植株。选择标记基因包括抗生素抗性标记基因和抗除草剂基因，其中用得最多的还是抗生素抗性标记基因。报告基因包括 β -葡糖醛酸苷酶（gus）、荧光素酶（luc）、氯霉素乙酰转移酶（cat）、绿色荧光蛋白（gfp）基因等。

标记基因通常与目的基因构建在同一植物表达载体上，一起转入植物，但标记基因本身有时也可以作为目的基因，如除草剂基因提供除草剂抗性。

人们担心使用这类食品后会使自己获得对抗生素的抵抗,生病时抗生素不再有用。然而,事实上并非如此。我们需要对标记基因做安全性评价。1993年WHO提出了转基因食品标记基因的安全性评价原则:①标记基因的分子、化学和生物学特性;②标记基因应与其他基因进行一样的安全性评价;③原则上某一标记基因的资料一旦积累,就可以适用于任何一种植物,并且可以适用于与任何一种目的基因连接。

2. 决定标记基因的安全性的因素

(1) 标记基因有无直接毒性。任何DNA都由4种碱基组合而成,目前使用的标记基因的DNA组成并无异常。据计算,24h内进入人体肠道的真核DNA在小肠中有200~500mg,在结肠中为20~50mg。使用转基因番茄FLAVR SAVR™(Calgene公司)后,在同样时间内摄入的卡那霉素抗性基因DNA估计为0.33~1.00pg,因此与消化道中持续存在的其他DNA相比是微不足道的。所有生物食品中含有大量的DNA,DNA在肠道中很快被降解,标记基因并无DNA组成异常,由此WHO(1991)和FDA(1994)认为食品中的转基因DNA本身并没有安全性问题。

(2) 基因水平转移(horizontal gene transfer)的可能性。食用转基因食品后,大部分的DNA已被降解,并在肠道中失活。极小部分(<0.1%)是否会有安全性问题?如标记基因尤其是抗生素标记基因是否会转移至肠道微生物中或上皮细胞中,而降低抗生素在疾病治疗中的有效性?

但是目前得出的结论是:这种可能极小,除非在某些特例中需要考虑,理由是:①DNA从植物细胞中释放出来后,很快被降解成小片段,甚至核苷酸,所以,植物DNA在进入有肠道微生物存在的小肠片段、盲肠、结肠前已被降解。②即使DNA完整地存在,DNA转移并整合进受体细胞也是一个很复杂的过程,包括许多步骤:DNA必须与细胞结合,穿过细胞膜进入细胞,且不被细胞宿主内的核酸酶及修饰系统降解;受体细胞必须呈感受态;为与受体细胞的基因组发生重组,供体和受体必须有一段20bp的DNA完全同源;要有合适的调控系统才能表达。标记基因的表达只有在筛选压下有优势,对抗生素标记而言,只有在口服抗生素下才有这种选择压,只有当抗生素抗性标记基因是在合适的细菌启动子的控制下,才可能使转化的受体微生物取得生长优势,目前尚不知在消化系统中植物DNA转移至微生物的机制;上皮细胞又因新陈代谢,半衰期很短而不断被取代,不能保存下来。因此标记基因水平转移并表达的可能性很小,工程植物原材料及未煮过的种子中DNA不可能产生安全性问题,经过食品加工后更加不可能会有安全性问题。所以,只有当标记基因转入发生,其特性威胁健康时,才有必要收集该基因转入的信息数据。但是在评估任何潜在健康问题时,都应该考虑人体或动物抗生素的使用以及肠道微生物对抗生素产生的抗性。

(3) 未预料的基因多效性。基因的多效性有的可预测,有的不可预测,其效应可有利或不利。所引起的不良性状可在常规育种中进行筛选。基因多效性包括次生效应,如插入位点及插入基因产物所引发的“下游”效应,影响代谢过程,如新霉素磷酸转移酶标记基因可改变细胞的磷酸化状态。

目前还无法预测基因的插入位点和做到基因的定点整合。由于基因整合的随机性,外源基因可插入植物基因组的非编码区、结构基因区或调控区,引起插入突变(如导致某一基因的失活),这是一种常见的现象,因为通常基因在转录活跃区的整合几率大于静止区。相反,若插入的基因

位点使阻遏基因失活，则可激活沉默基因。插入突变的表型可能很小甚至觉察不到，也有可能很大甚至致死。

插入突变可在育种时进行选择，即在育成品种及商用化以前进行淘汰，除去不良性状。育种家更注重的是稳定性，会否在后代中失去所期望的优良表型性状。

虽然基因多效性有不利的一面，但是至今还未发现有随机插入激活毒性代谢途径的报道，WHO (1993) 的结论认为，尚无标记基因插入不同位点而引起特殊的次生效应或多效性的证据，标记基因的次生效应应作个案处理，即比较转基因植物与常规植物的关键成分是否有实质等同性。

(4) 标记基因编码蛋白的安全性。标记基因编码蛋白的安全性包括直接毒性、过敏性、和因蛋白的催化功能而产生的副作用，应考虑的主要问题是蛋白水平及其摄入量，以及在消化道中的稳定性。蛋白在消化道中被降解为小肽和氨基酸，工业用酶的设计主要是使酶能忍受极端环境(如酸、热)，其设计原则和结构基元序列有很多已经很清楚。植物转化中的标记基因无特殊性，不能与工业用酶一样能忍受极端环境，在模拟试验中可以观察到许多蛋白很快被降解。

① 标记基因编码蛋白的直接毒性：已知很多蛋白对人体有毒性，在正常膳食中无这类蛋白(如细菌毒素和蛇毒)，大量结构和功能不同的蛋白已有长期安全食用的历史。植物遗传转化中的用到的标记基因，目前尚无直接毒性的证据，经与毒性蛋白的氨基酸序列比较，没有显著的同源性。标记基因产物降解后，也无证据说明它产生的多肽比其他蛋白产生的多肽毒性大，因此不可能产生新的毒素和安全性问题。

对于来自细菌的标记基因，目前还无证据说明因翻译后修饰是否会产生毒性。

② 蛋白质的过敏性：如果转移的标记基因来自已知的食物过敏原，则应考虑转基因植物中表达的蛋白是否有致敏性。目前尚无标记基因编码的蛋白有过敏性的事例，它们在消化系统中很快被降解也支持了这一证据。

③ 蛋白功能及其安全性：除了标记基因编码蛋白的直接毒性和过敏性外，还应该考虑所编码蛋白的催化功能，即对宿主的代谢是否会产生影响。催化功能取决于是否要求有辅助因子，若需要，则要考虑在消化道中是否存在及存在的数量，还要考虑底物的专一性和在植物中的降解方式。对抗抗生素标记而言，用抗生素治疗人和动物时，抗生素的口服剂量是否会失效，这当酶在消化道中仍然存在时会发生。

3. 常见的抗性标记基因 有抗卡那霉素基因、抗新霉素基因、抗草甘磷基因和 GUS 报告基因。

对这些主要的标记基因已展开了不少详尽的研究和分析，对其安全性也有比较充分的认识，部分标记基因已被列为可安全使用的标记基因，如抗卡那霉素标记基因、抗草甘磷标记基因等。可安全使用的标记基因是标记基因本身(启动子和终止子除外)及其主要产物可安全地作为食品。可安全使用是指可无任何限制地用于作物转化外，但同时还含有有条件地安全使用的含义，即有某些限制，如拷贝数等。必须指出的是，随着试验数据和经验的积累补充，可安全使用的标记基因名单还会有所修正丰富。

与人畜疾病中抗生素的滥用相比，转基因作物引起的抗性增加是微不足道的。科学家也在研制更安全的标记基因，如甘露糖-6-P-异构酶。同时，种植面积很大的转基因玉米和大豆产品，

包括婴儿食品，迄今在美国市场上已接近4 000种，但是尚未发生一例食品安全事件。

(四) 转基因食品对人类健康长期影响的不确定性

一些学者认为转基因食品用于生产和消费的时间较短，需要进一步研究和证实它的安全可靠性。转基因食品对人类健康和环境的影响要经过长期的考察，才能确定其安全性。转基因食品是最近才发展起来的，经历的时间较短，还没有足够的时间来确认其可靠性。

七、转基因食品无需担心的理由

尽管有上述的种种原因，但是，人们还是不用担心转基因食品的安全性。因为：

①随着人们对人类健康和生态的日益重视和关注，有关部门逐步建立健全食品安全法规和法律，规范管理食品生产加工过程中的工艺和生物技术操作，保证了食品的安全性。目前相关的管理法规《基因工程安全管理办法》、《农业生物基因工程安全管理实施办法》、《新资源食品卫生管理办法》，对转基因食品而制定的专门的法规，随着技术发展而不断地修正。

②转基因食品在上市前都有很严格的检验，包括营养学和毒理学的评价等。

③转基因食品中的标记抗性基因不会也不可能为人体所接受。

④毒性是否会为人体接受和在人体内积累能用试验验证。在转基因作物和转基因食品出台前，都要经过安全性评价，对于某些特殊的食品要经过动物试验，确认安全无毒后再投放市场。

第四节 转基因食品的检测

当大量转基因食品进入市场时，建立适当的方法对转基因食品进行检测就显得特别重要，检测内容主要是该批食品是否为转基因产品、转基因产品的百分含量以及是否为国际上公认的安全性的转基因产品，这是对转基因食品进行安全性评价和流向及用途实施监管的基础。

我国是世界上转基因作物第一个商品化种植的国家，美国一家烟草公司一直收购河南烟草，但当得知进口烟草中有转基因烟草后，他们停止了从中国进口。由于大量的烟草积压，河南省有关部门发文停止了转基因烟草的种植。欧盟在从进口我国酱油时，明确要求原料为非转基因产品。而我国一些酱油厂所用的原料大豆和豆粕相当一部分是从美国、阿根廷、巴西等国进口的，而这些国家是目前世界上种植转基因大豆最多的国家。用这些原料加工的酱油极有可能被欧盟检出含有转基因成分而被拒收和退货。而欧盟这个市场一旦失去就很难恢复，冻禽肉出口欧盟受阻的前车之鉴教训十分深刻。所以检验检疫系统开展对转基因产品进行检测，已显得十分迫切。

建议在全国进口食品和农产品检验业务量较大，人员技术、设备条件及与科研机构协作条件较好的检验检疫机构建立转基因食品检测实验室或从事转基因食品的检测工作，加快研究制定转基因食品的检测方法。

面对转基因食品，世界上的趋势是：对相关食品，必须给消费者一个真实而明确的信息。因此，不论是对转基因食品加贴标签，还是对转基因食品和非转基因食品原料的分别输送，转基因原料和食品的检测技术都是必不可少的。

目前，转基因食品的检测方法主要有：PCR 技术（polymerase chain reaction 聚合酶链式反

应)、ELISA(酶联免疫法)、凝胶电泳和测序法等。这些技术在食品和医药行业均有很广泛的应用。酶联免疫法,虽然检测灵敏度提高,但容易引起交叉感染,产生拟阳性的问题,因此必须小心操作。此外,蛋白质加热后会变性,这为采用ELISA技术检测一些油炸或经过加热处理的食物带来一定的困难。所以总体来说,PCR技术最为成熟。

PCR技术又称体外核酸扩增技术,是基于分子生物学原理之上的,是一种有效的DNA扩增技术,能用于提高核酸检测的灵敏度。一定长度和序列的目标核苷酸片段,通过不断链变性、退火和热稳定DNA聚合酶(*Thermus aquaticus* Taq)的扩增,30个周期之后,单目标序列可在2~3h内扩增几百万倍。它将从样品中提取出来的DNA溶液中的转基因作为模板,使其增殖以便于检测的一种方法,该技术目前已经广泛应用于医药工程、遗传工程和食品等各领域。在食品检测上,该方法具有快速、灵敏等特点。

PCR技术能鉴别某食品是否是转基因食品,但是一旦食品经过加工后结构发生了很大的变化,很难用一般的方法确定其是否是转基因食品,而且食品的安全性也不能仅从上述的结果来判断。所以,对于转基因食品,应用高新技术来展开全面严格的检测和安全性评价对于推广转基因食品是极为重要的。

PCR检测有定性和定量检测两种方式,人们大多以定性检测为主,定性检测的检测范围在0.1%。而在定量检测中,若以大豆为检测体,检出范围为0.01%之内,检测精度为99%。定量检测要用专门的装置。

第五节 问题和展望

转基因技术应用于动物、植物和微生物的商业化已经成为一种趋势,但是在转基因食品的发展中仍然存在着一些问题需要解决。

建立在植物基因遗传修饰基础上的食品工业正遭受挫折。现在,欧洲公众对这一产业的态度至少是怀疑的。然而,如果有关转基因食品的技术、规章和与公众交流等方面能够不断取得进展并保持下去的话,公众最终将能够接受转基因食品。

使转基因食品在广泛的自然食品的包围中开始被公众接受,应当成为继续工作的重点和首要任务。持续的传统农业和新兴的其他形式的农业之间的冲突是建立在技术因素和社会因素的差异之上的。如果能在更大的程度上达成被公众接受的折中方案,这种冲突可以解决。这样,在考虑转基因作物的真正的风险的时候,公众的考虑中理性的因素会增加,从而避免了一味的恐惧和否定的情况发生。

一、相关的法律和政策不完善

由于转基因食品本身存在的缺陷,而没有一套相关的完整的法律、法规,故使得人们心存疑虑。因此,对每一种转基因食品安全性加强监测,对其提出的申报材料中的安全性分析及实施报告,尤其是毒性、过敏性分析及抗生素抗性问题更要严格把关。同时,应制定一套完整有效的长期监控体系,建立和完善相应的法律、法规,确保转基因食品的安全性。此外,在监控管理方

面，应提高公众的参与性以及透明度，避免出现为了经济利益而出现的暗箱操作。

二、尊重消费者的知情权和选择权

作为消费者，有权知道转基因食品的优点及可能存在的安全性问题，有权选择是否食用转基因食品，这就要求每一种转基因食品（无论有无潜在危险性）都必须贴上标签，以与天然食品加以区别，使消费者自主加以选择。在上市初期最好每一种转基因食品能同时附上一份详细的资料，包括该食品的转入基因、标记基因、优点及可能的危害等方面的内容，以帮助选择是否食用，充分保障消费者的自主权。

三、树立对消费者负责的态度

作为科研工作者，首先应当尽职尽责，不断掌握新的专业知识，了解本学科的最新发展动态，及时听取消费者的建议，尽可能地减少转基因食品的风险性，做到对生态环境和消费者负责。其次，许多消费者食用转基因食品后，由于对该食物安全性认识不够，可能会存在一定的精神压力和恐惧心理。作为科研者应定期给消费者进行宣传教育，并建议消费者定期进行健康查体，包括过敏反应和抗生素抗性等方面的检查，以消除消费者的恐惧心理和紧张情绪，使消费者放心。

因此在我国已加入 WTO 的情况下，必须加强食品安全性方面的研究，完善法规管理体系为推动和促进转基因工程的产业化奠定基础。当前迫切需要进行的工作主要有：

（一）建立专门的转基因食品安全法规

目前对转基因食品的管理尚缺乏可操作性，急需制定专门的法规，并确保法规随技术发展而不断修订。这也是由于经济全球化，而使世界各地食品及食品加工原料跨国、跨地区流通所必需的。

（二）建立完善转基因食品的安全管理机构体系

目前我国新食品的管理归卫生部，转基因生物种植和商业化生产的管理归农业部审批，加工食品的管理归国家轻工业局，而食品销售涉及国内贸易部，进出口由外经贸部、进出口检疫局等部门负责。所以需要各部门的同时能协调一致。

（三）建立转基因食品的安全性评价的技术支撑体系

转基因食品的安全性评价的原则是实质等同性，而实质等同性需要比较转基因生物的供体和受体的多种参数。这是目前任何科研单位都无法独立完成的，需要授权有关机构承担这一任务。同时应重视建立我国生物安全性评价的数据库，并做到定期更新和维护。

（四）大力加强有关转基因食品安全性的基础性研究工作

目前应重点支持以下几方面的工作。

1. 规范化的动物模型研究 因为食品安全涉及的不仅是人类健康，还有其他动物（饲料）的安全，所以应建立有针对性的不同类动物模型，至少包括一种哺乳动物、一种鱼类和一种无脊椎动物，以便对食品安全做全面评价。

2. 在确立动物模型的基础上，改进动物实验方法，适应转基因食品的需要 研究可预测特

定的毒理学分界点的敏感参数的识别，建立针对转基因食品中毒物、抗营养因子、激素类、过敏物质等规范的动物试验标准。

3. 加强转基因食品中对外源基因可能编码过敏原的研究 以及这些过敏原的免疫特性的研究；发展人体口服摄入的蛋白质致敏性的动物模型，建立过敏原检验方法。

4. 加强对转基因食品来源中含有抗营养因子及激素类影响的研究 这类物质对人或动物的影响是不易在短期内察觉的，原有的动物试验很难满足对这类物质的安全性评价。

主要参考文献

- [1] 刘谦, 朱鑫泉. 生物安全. 北京: 科学出版社, 2001
- [2] 樊龙江, 周雪平. 转基因作物安全性争论与事实. 北京: 中国农业出版社, 2001
- [3] 彭志英主编. 食品生物技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- [4] James C. 基因修饰植物的开发和全球分布. 生物技术食品 (转基因食品) 国际研讨会. 北京: 1999.10
- [5] 张志强. 中国对新食品食用安全性的立法与监督管理. 生物技术食品 (转基因食品) 国际研讨会. 北京: 1999.10
- [6] 罗伯特·梅. 基因改良食品: 事实、担忧、政策和公众的信心. 生物技术通报. 1999 (3)
- [7] 钱迎倩. 转基因作物的利弊分析. 生物技术通报. 1999 (5)
- [8] 贾士荣. 转基因植物的环境及食品安全性. 生物工程进展, 1997, 17 (6)
- [9] 钱迎倩, 田彦, 魏伟. 转基因植物的生态风险评估. 植物生态学报. 1998, 22 (4)
- [10] 李宁, 韩驰, 陈君石. 生物技术食品的安全性评价. 国外医学卫生学分册. 1998, 25 (2)
- [11] Rome. Report of joint FAO/WHO Consultation WHO Biotechnology and Food Safety. WHO, 1996
- [12] 贾士荣. 转基因植物食品中标记基因的安全性评价. 中国农业科学, 1997, 30 (2)
- [13] 贾士荣. 生物技术与食品安全性. 生物技术通报. 1997 (1)
- [14] 贾士荣. 转基因作物的安全性争论及其对策. 生物技术通报. 1997 (6)
- [15] FAO/WHO. FAO/WHO Biotechnology and Food Safety. Report of Second Joint FAO/WHO Consultation, 1999
- [16] Metcalfe D D, Astwood JD, Townsend R et al. Assessment of the Allergenic of Food Derived from Genetically Engineered Crop Plants. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 1996 (36)
- [17] Neumann D A. 北美对来源于生物技术的食物进行安全性评价和标签的方法. 生物技术食品 (转基因食品) 国际研讨会. 北京: 1999.10
- [18] OECD. OECD (Organization for Economic Corporation and Development) Safety Evaluation of Foods Produced by Modern Biotechnology. Concepts and Principles. Paris: 1991
- [19] WHO (World Health Organization). WHO Strategies for Assessing the Safety of Foods by Biotechnology. Report of a Joint FAO/WHO Consultation