

现代生物技术在乳品工业中的应用研究

赵志华¹ 岳田利¹ 王燕妮² 袁亚宏¹

(¹西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 杨凌 712100; ²山东凤祥集团总公司, 阳谷 252325)

摘要: 随着细胞生物学和分子生物学的发展及对生物物理、生物化学、遗传学和免疫学研究的深入, 培育了基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程等改变生物特性进行物质转化的现代生物技术, 形成了 DNA 探针、PCR 技术、分子标记、生物荧光技术、基因芯片技术等前沿性的生物检测技术, 其在乳品工业中的广泛应用, 推动了乳业的技术变革, 对乳品生产、研究和乳品安全意义重大。

关键词: 生物技术 乳品工业 乳品安全 应用研究

The Application Research of Modern Biotechnologies in Dairy Industry

Zhao Zhihua¹ Yue Tianli¹ Wang Yanni² Yuan Yahong¹

(¹Northwest A & F University Food Science & Technology College, Yangling 712100;

²Shandong Fengxiang Group General Company, Yanggu 252325)

Abstract: Along with the development of the cytobiology and the molecular biology, and thoroughly research of the biophysics, the biochemistry, the genetics and immunology, It has cultivated the modern biological technology, such as genetic engineering, cellular engineering, Enzyme engineering, fermentation engineering and so on, to change biology characteristic to carry on the material transformation, has formed the front biological examination technology: the DNA probe, the PCR technology, the molecular mark, the bioluminescence technology, genechip technology and so on. The widespread application of these advanced biotechnologies in dairy industry has impelled the dairying technical transformation, and has been having vital significance to dairy production, research and dairy product security.

Key words: Biotechnology Dairy industry Dairy safety Application research

牛乳是营养丰富的天然食品, 2003 年我国乳制品产量比上年增长了 32%, 液态乳年平均增长率高达 47%^[1]。在分子生物学和细胞生物学基础上多学科渗透发展而成的基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程等生物技术, 在乳品工业中的广泛应用大幅度提高了乳品的原料品质和储存特性, 改善了牛乳的营养成分, 构建了基因工程菌, 增强了免疫功能。DNA 探针、PCR 技术、分子标记、生物荧光技术、基因芯片技术等现代生物学的发展, 符合现代社会对快速检测的要求。现代生物技术全面提高了乳品的技术含量, 加速了技术装备水平现代化,

加工生产规模化, 经营管理科学化的进程, 对健全乳业质量安全检测体系, 推动乳业产业升级, 生产绿色、安全、营养的乳品提供了有效的保障。

1 现代生物技术在乳品加工中的应用

1.1 基因工程

1.1.1 改善乳品品质 牛生长激素 (Bovine somatotropin, BST) 是一种垂体多肽激素, 奶牛的育性、生长速度、产乳量等性状都受到激素的调节, BST 的浓度与奶牛泌乳量正相关。利用 DNA 的克隆繁殖, 将分离纯化得到的 BST 注射到牛体内, 产乳量可提高 15%~20%。由于牛乳经热杀菌处理 BST 可

收稿日期: 2006-01-23

基金项目: 陕西省科技攻关项目 (2001K04-G10-01)

作者简介: 赵志华 (1978-), 男, 河南周口人, 硕士研究生, 曾任山东凤祥集团副经理, 现主要从事食品生物工程新技术研究

通讯作者: 岳田利 (1965-), 男, 陕西凤翔人, 教授, 主要从事食品生物工程新技术研究

减少 85%~90%,同时,蛋白酶和肽链内切酶也会消化一部分 BST,而人与 BST 的氨基酸序列只有 35%的同系物,且不发生特异性结合,不存在安全性的问题^[2]。酪蛋白(α_1 -, α_2 -, β -)占总蛋白的 80%以上,是改善乳成分研究中最有价值的一类磷蛋白,目前已培育出能表达所有酪蛋白基因的牛乳腺上皮细胞系 MAC-T。利用酪蛋白启动子和 hIFcDNA 构建的转移基因,通过奶牛的生理机制,获得含有人乳铁蛋白的牛乳;针对 β -乳白蛋白的 mRNA,用 DNA 编码的转基因,使与乳糖合成有关的 β -乳白蛋白的基因被淘汰,从而降低乳中乳糖的含量。由于牛乳中酪蛋白分子含有的丝氨酸磷酸,易结合 Ca^{2+} 使其沉淀,通过基因操作,使 k-酪蛋白分子中 Ala-53 被丝氨酸置换,提高了磷酸化程度,使 k-酪蛋白分子间斥力增加,增强了牛乳的稳定性^[3]。

1.1.2 构建基因工程菌和重要的酶 降解胆固醇的微生物或其代谢产生的胆固醇氧化酶(EC1.1.3.6;COX),COX 的氧化产物胆甾-4-烯-3-酮具有预防、治疗肝病和抗肥胖的作用,利用优化的芽胞杆菌与嗜热链球菌和嗜酸乳杆菌,用原生质融合技术构建了高效降解胆固醇的乳酸菌^[4]。用基因工程方法得到的重组凝乳酶与天然牛乳酶在本质上无区别。将携带凝乳酶原基因的质粒 PMG13195 导入 E.coliMT 中,然后在含有胰蛋白酶、酵母膏和乳糖的培养基中 37℃ 培养,重组凝乳酶原在包含体内逐渐积累。利用 DNA 重组技术将编码牛凝乳酶的基因在乳酸克鲁氏酵母表达,K.lactis 能有效地把凝乳酶原分泌到培养基中,已开发出耐高糖、耐酒精且产酒精速率快的乳糖酵母和重凝乳酶^[5]。基因工程的应用显著提高了菌种的遗传特性、抗噬菌体能力和发酵性能,赋予产品良好的风味、营养及一定的功能特性。

1.2 免疫乳技术

牛乳中的免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig) 有 IgG、IgA、Ig M、IgE 和 IgD 等五种,可抑制、杀灭肠道病原菌,改善肺和心血管功能,抗破伤风毒素,降血脂,预防龋齿及牙周炎等口腔疾病。利用基因技术置入外来基因使乳中产生具有免疫功能的蛋白质物质,但这种方法存在潜在技术和成本的瓶颈,而免疫乳技术弥补了这种缺陷。通过选择能引起动

物机体产生免疫应答反应且能分泌特异性抗体的抗原,注射到奶牛体内产生 IgG、IgA、Ig M,其活性提高 8 倍^[2]。

1.3 酶工程

酶工程在乳品工业中的应用主要结合微胶囊技术和固定化技术,微胶囊技术(Microencapsulation)通过天然与合成的高分子材料,将微小物质经包裹形成直径为 50~200 μ m 的微型囊,主要用于新型乳制品的开发、干酪生产所用微胶囊酶制剂的制取及益生菌和 DHA 等生理功能物质等的包埋,能最大限度地维护囊心物的色香味、性能和生物活性,防止营养物质的破坏和损失^[6]。固定化技术(Immobilizing)使酶类或微生物菌体固定化,保留其固有的催化活性和存活力,可连续多次重复使用,广泛用于乳品工业中的乳糖水解、牛乳过敏症防治及综合利用乳清制造乳酸、乙酸、获得具有抵制 ACE、抗菌、免疫调节等多种功能的生物活性肽等,同时减少乳中的苯丙氨酸,避免苯酮尿症,还可对乳脂肪进行修饰,提高稳定性。目前,形成了固定化乳糖水解酶、固定化凝乳酶和固定化特殊蛋白酶。

1.4 发酵工程

发酵工程主要利用菌株的生理生化代谢机制,用于菌体生产和代谢产物的发酵生产,生产酸奶和奶酪。发酵乳能发送肠道菌群、整肠和预防肠道疾病、降低血中胆固醇水平、抗肿瘤等,主要产品有能产生酒精的酸牛乳酒(Kefir)、酸乳(Yoghurt)、发酵酪乳(Fermented butter milk)、双歧杆菌乳(Bifidobacterium bifidum milk)、嗜酸菌乳(Acidophilus milk)和发酵稀奶油(Fermented cream)^[5]。现代发酵工程形成的生物反应器可进行连续式的生产酸乳、干酪等乳制品。

2 现代生物技术在乳品检测中的应用

2.1 DNA 探针

DNA 探针技术就是能识别特异碱基序列的一段与被测定的靶序列互补的带有标记的单链 DNA 或 RNA 分子,经标记后可作为探针用于杂交核酸检测,常用的 ^{32}P 、 ^{35}S 和 3H 标记的三磷酸核苷酸等放射性标记物和生物素、荧光素及地高辛配基等非放射性标记物。目前,DNA 探针可检测乳品中的大肠杆菌、志贺氏菌、李斯特菌、沙门氏菌和金黄色葡

萄球菌等。此外, DNA 探针还用于双歧杆菌的鉴定, 并获得双歧杆菌属特异的寡核苷酸片段 1m3, 序列为 5'-CGGGTGCTICCCACTTTCATG-3', 利用 1m3 分别用 ^{32}P -ATP 和地高辛-11-UTP 标记为放射性探针, 与所有双歧杆菌属的种有杂交信号, 与其它菌无反应^[7]。

2.2 PCR 技术

聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 是利用单链寡聚核苷酸引物特异 DNA 片段反复进行变性、退火、延伸循环, 进行体外扩增的方法, 能从极微量的 DNA 乃至单细胞含有的 DNA 起始, 扩增出 μg 级的 PCR 产物。目前, 从脱脂乳、全脂乳和干酪中直接提取金黄色葡萄球菌 DNA 进行 PCR 检测, 但前者比后者进行 PCR 检测更为有效^[8]。以 *slt-*、*slt-*、*eae*、*rfb*、*hly*、*uidA*、*fliC* 基因为靶基因, 可用于牛乳中大肠埃希氏菌 O157 H7 的 PCR 检测, 检测下限为 $5.8 \times 10^2 \text{CFU/ml}$ ^[9]。利用 Bif164 和 Bif662 作为引物, 对人体内的 12 种双歧杆菌进行选择性地扩增 rDNA 片段, 用 *Sau3A*、*TaqI*、*RsaI*、*AluI* 和 *Sau961* 等 5 种不同的限制内切酶进行酶切, 根据产生的具有特征性的指纹图谱进行鉴定^[10]。基于 PCR 发展起来的实时 PCR 技术 (Real-time PCR) 是一种新型的可作定量分析的 PCR 技术, 其核心是利用荧光对核酸分子进行检测, 常用 SYBR GreenI 和荧光共振能量转移 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) 杂交探针, 荧光强度与 PCR 产物的数量是一一对应的关系, 并可有效防止检测过程中的污染和假阳性。

2.3 分子标记技术

基于 DNA 多态性, 已发展 10 余种分子标记技术 (Molecular marker), 常用的是限制片段长度多态性 (RFLP)、随机扩增多态性 (RAPD)、两单序列重复程度多态性和序列标志位点 (STS)。与传统的遗传标记技术相比, DNA 分子标记数量多, 在同一基因位点有较多的复等位基因; 对重要的经济性很少有不良效应; 其多态性可在个体、组织器官及细胞水平上进行检测, 不受环境条件的限制^[11]。在乳酸菌、双歧杆菌等益生菌种鉴定、遗传多样性分析等方面有广泛的应用。

2.4 生物荧光技术

生物荧光技术 (Bioluminescence) 主要指 ATP 生物荧光技术和细菌生物荧光技术。ATP 生物荧光技术是在荧光素酶的作用下, 由 ATP 激活, 荧光素被氧化, 发生能量跃迁产生荧光光子 (Hr), 荧光强度与 ATP 浓度在一定范围内线性相关, 而 ATP 在生物活细胞内的含量大致一定, 从而可测出样品中的微生物含量。通过线性回归方程, 由 ATP 值可预测原料乳中的总菌数 (SPC) 和体细胞浓度^[12]。在卫生监测中, 5min 可检出结果, 其结果与平板计数法得到的结果相关性约为 80%^[13], 同时也可用于巴氏杀菌乳的货架期制定及牛乳中抗生素或噬菌体残留的快速检测。细菌生物荧光技术利用分子遗传学原理, 将细菌生物荧光的特异性 LUX 基因导入宿主细菌噬菌体中并使其发光, 其强度与感染细菌的数量成比例, 可用于检测乳酸乳球菌、干酪乳杆菌等发酵剂的活性检测^[14]。

2.5 ELISA 技术

酶联免疫分析技术 (Enzyme Link Immunosorbent Assay, ELISA) 是以抗原和抗体的特异性结合为基础的免疫化学技术, 利用酶催化底物反应的生物放大作用, 提高特异性抗原、抗体免疫应答的敏感性, 主要有测定抗体的间接法、测定抗原的双抗体夹心法和测定抗原的竞争法。ELISA 对乳铁蛋白 (BLF) 可进行定性、定量的检测, 检测范围为 25 ~ 800 $\mu\text{g/L}$, 灵敏度为 25 $\mu\text{g/L}$ ^[15]。由 α -酪蛋白经消化酶水解产生的活性肽 α -Casomorphin-7, 氨基酸序列为 TryProPhePreGlyProlIle, ELISA 对其的检测检测范围 20 ~ 320ng/ml, 灵敏度 20ng/ml, 与其它内源性活性肽和神经因子通过竞争抑制试验, 未发生免疫交叉反应^[16]。黄曲霉毒素 M1 (AFTM1) 是由于乳牛食用了 AFTM1 污染的饲料而引起, 用 ELISA 检测 AFTM1 的残留量, 浓度大于 30ppt 时, ELISA 比高效液相色谱的精确度和准确度高^[17]。应用 ELISA 可检测奶酪和酸牛奶中常见的青霉、毛霉和曲霉等。组胺是“奶酪综合症”的病因, 通过直接竞争 ELISA 分析奶酪中的组胺, 效果明显。ELISA 对乳中磺胺甲基嘧啶残留的测定, 检测质量浓度为 5 ~ 220 $\mu\text{g/L}$, 检测限为 2.4 $\mu\text{g/L}$, 与磺胺二甲氧嘧啶和磺胺脒无交叉反应^[18]。

2.6 基因芯片技术

基因芯片(Genechip)是生物芯片的一种,它是近几年发展起来的高新技术,具有高度并行性、多样性、微型化和自动化等特点,它通过固相的介质芯片,微生物样品 DNA 经 PCR 扩增后制备荧光标记探针,然后再与芯片上寡核苷酸点杂交,最后通过扫描仪定量和分析荧光分布模式来确定检测样品是否存在某些特定微生物,它是对传统生物技术创新和飞跃。通过设计通用引物扩增细菌核糖体 16S rRNA,并将扩增产物与含有探针的低密度芯片进行杂交,从而直接检测鉴定微生物^[19]。用基因芯片技术对与致病机制相关的细菌基因组中存在的特异标记进行检测,能成功检出致病菌的致病因子,进而对细菌病原菌进行自动检测和鉴定^[20]。通过单管复合体扩增和基因芯片技术检测和鉴别 6 种李斯特菌^[21]。通过分析 E.coliO157:H7 的 Shiga 样毒素、Shiga 样毒素 及溶血素 A,发现基因芯片可准确检测各种 E.coliO157:H7 分离物^[22]。

3 展望

现代生物技术在乳业中能从微观的分子水平上认识物质,进行分子操作来生产乳品,加快了现代乳品加工技术创造性的融合和发展,但生物技术在新产品中导入了外源基因或改变了原有的基因表达方式,这就涉及到转基因(Genetically Modified, GM)食品的安全性问题,目前对 GM 食品的评价遵循“实质等同性”原则。酶联免疫吸附检测法和 PCR 法可用于转基因食品的检测,而基因芯片技术灵敏性好、特异性强、假阳性低及准确率高,可对转基因食品进行定性、定量的检测^[23],但由于食品是多种化合物的混合物,GM 食品中的新组分可能与已有的有毒成分发生不利的安全作用,有必要建立食品安全性的有效方法。因此,生物技术在乳品工业中的应用是机遇与挑战并存。随着分子生物学、生物信息学和计算机科学等多学科的交叉发展,基因工程、细胞工程和发酵工程等将相互融合, DNA 探

针、PCR 技术、生物芯片技术等检测技术之间将联合使用,现代生物技术为乳品生产的全程质量控制、构建有效的乳品安全体系等方面将发挥更大的作用,生物技术无疑将成为 21 世纪最具活力的技术,在乳品工业中前景广阔。

参考文献

- 1 赵志华,岳田利,王燕妮,等.中国乳品工业,2005,33(10):51.
- 2 南庆贤,韦薇,范丽芳.食品与机械,2000,2:10.
- 3 周家春主编.食品工业新技术.北京:化学工业出版社,2004,7~9.
- 4 王成涛,牛天贵,岳晓禹,等.食品与发酵工业,2002,28(3):1~4.
- 5 彭志英主编.北京:中国轻工业出版社,1999,27~221.
- 6 秦立虎,宗青山,孙武斌.中国乳业,2003,6:22~25.
- 7 Kaufmann.P, Pfefferkorn.A, Teabo M. Appl Environ Microbiol, 1997,63:268.
- 8 C-H Kim.Dairy Sci,2001,84:74~83.
- 9 Sharma VK, Dean-Nystrom EA. Vet Microbiol, 2003, 93(3):247~260.
- 10 Koen V, Annet J, Maathuis A. A Fems Microbiology letters, 2003,22(4):143.
- 11 黎裕,贾继增.生物技术通报,1999(4):19.
- 12 Samkuty P.J.Food Port,2001,64(2):208~212.
- 13 Finger R, Slesho WM. Dairy Sci, 2001,84(4):818~823.
- 14 Stewart G, Smith T, Denyer S. Food Sci Technol, 1998,3:19.
- 15 林成招,张彦明,邹思湘,等.中国乳品工业,2003,31(4):44~46.
- 16 张源淑,钟海涛,邹思湘.食品科学,2002,23(2):95~97.
- 17 ABiancardi. Industrie Alimentari,1997, 36(361):870~876.
- 18 吴定,张羽航,姚汝华.中国兽医学报,1999,19(2):175.
- 19 Jack S, Douglas RC, Fred JB, et al. App Env microbid ,2001,67:4708~4716.
- 20 Chizhkov V, Rasody A, Chumakov K, et al. App Environ Microbiol, 2001,67:3258~3263.
- 21 Vdolkhov D, et al. Clin Microbiol ,2002 ,40:4720~4728.
- 22 Call. DR, et al. Food Microbiol ,2001,67:71~78.
- 23 吕山花,邱丽娟,陶波.生物技术通报,2002,(4):34~38.