

转基因大豆不同加工过程 DNA 降解研究

叶可萍¹, 周光宏^{1,*}, 徐幸莲¹, 祝长青^{1,2}

(1.南京农业大学 教育部肉品加工与质量控制重点实验室, 江苏 南京 210095;

2.江苏出入境检验检疫局, 江苏 南京 210001)

摘 要: 转基因大豆及其加工品已进入我国市场, 但其食用安全性仍存在争议。本文深入研究转基因大豆加工过程中内、外源 DNA 的含量及降解程度, 为其进入下游食物链的监控追溯提供有效的科学依据。

关键词: 转基因大豆; 加工; DNA 降解; 食品安全

DNA Degradation of Genetically Modified Soybean during Processing

YE Ke-ping¹, ZHOU Guang-hong^{1,*}, XU Xing-lian¹, ZHU Chang-qing^{1,2}

(1. Key Laboratory of Meat Products Processing and Quality Control, Ministry of Education, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China)

Abstract: Genetically modified soybean and its products were in Chinese markets; however, the safety of these products is still being debated. In this paper, current research progress in degradation of DNA derived from genetically modified soybean during its processing has been discussed. This investigation will provide effective and scientific references for the traceability and monitoring of genetically modified soybean in food chains.

Keywords: genetically modified soybean; processing; DNA degradation; food safety

中图分类号: Q751; Q949.751.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)13-0312-05

转基因大豆是目前种植面积最广、产量最大的商品化种植转基因作物。从 1996 年至 2004 年世界转基因大豆种植面积从 50 万 hm^2 增至 4840 万 hm^2 ^[1-8], 至 2008 年世界转基因大豆种植面积达 6580 万 hm^2 , 占有转基因作物面积的 53%^[9]。

第一个大面积生产应用的转基因大豆是抗除草剂草甘膦大豆(round-up ready soybean, RR 大豆), 由美国 Monsanto(孟山都)公司 1994 年推出, 并于 1996 年获准推广, 成为最早获准推广的转基因大豆品种^[10]。其应用 Ti 质粒介导转移 DNA(TV-DNA)转移技术, 将矮牵牛 Ti 质粒的 CaMV 35S 启动子控制 EPSPS 基因导入大豆, 进而培育成的具有抗除草剂草甘膦特性的转基因大豆品种^[11-12]。

我国是世界上最大的转基因大豆进口和消费大国, 同时也是世界四大大豆主产国中唯一没有批准商业化种植转基因大豆的国家。从国内大豆产量来看, 2000 年达到 1530 万 t, 2005 年达到 1780 万 t, 2007 年达到 1550 万 t, 2008 年为 1750 万 t, 2008 年比 2000 年增长 14.3%,

平均年递增 1.9%。从国内大豆进口量来看, 据海关统计, 2000 年约 1024 万 t, 2005 年约 2659 万 t, 2007 年为 3082 万 t, 2008 年达 3700 万 t, 2008 年比 2000 年增长 261%^[13]。从这些数据可看出, 越来越多转基因大豆进入我国市场, 其加工品已广泛地进入我国食物链。

1 转基因大豆及其加工品的食用安全性

至今尚未发现食用转基因大豆及加工品对人类健康有害的实例^[14], 但各领域对其安全性的争论从未平息。Barabara^[15]发现, 转基因大豆含有一种类似雌性激素的化学物质, 人类食用后会对人体荷尔蒙有一定影响, 导致生殖器官异常, 免疫系统发生障碍。Hardell 等^[16]认为如果转基因大豆抗生素标记基因进入人体, 可能转移到有害致病菌中, 使它们产生耐抗生素的能力, 从而降低抗生素的临床有效性, 也可能使人体对很多抗生素产生抗性。菲律宾的儿童食品中含有转基因大豆成分, 部分婴儿对其中一些新蛋白质产生了不良反应。2002 年 7 月英国食品标准局委托纽卡斯尔大学研究显示, 人类

收稿日期: 2009-11-13

基金项目: 农业部转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08012-014B)

作者简介: 叶可萍(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全。E-mail: yekeping.arc@163.com

* 通信作者: 周光宏(1960—), 男, 教授, 博士, 研究方向为肉品加工质量控制与食品安全。E-mail: ghzhou@njau.edu.cn

食用转基因大豆制成的汉堡包和奶制品后,其肠道细菌内仍带有经改造的基因^[17]。《纽约时报》2001年8月17日报道,比利时科学家在RR转基因大豆中发现一些来历不明的未知DNA,其只出现在RR转基因大豆中,位于人工插入的基因^[10]。2004年意大利乌尔比诺大学学者实验表明,转基因大豆可改变小白鼠肝脏结构。叶增民等^[18]认为我国进口转基因大豆及加工品可能会在30年甚至更长时间后对人类健康等方面产生影响。

2 转基因大豆的优势及国内加工趋向

与国产大豆相比,进口转基因大豆存在较大竞争力,对我国传统大豆形成了巨大的冲击。我国传统大豆的竞争力相对较弱,主要表现在^[19-20]:1)生产成本较大。转基因大豆生产成本比传统大豆低30%~35%,而产量却高出15%~20%;2)流通费用过高。我国大豆生产主要集中在东北三省,而大豆需求主要在东南沿海地区,如大型榨油厂一般都集中在我国南方沿海地区;3)品质较差。我国大豆出油率低,进口转基因大豆的出油率在19%~20%,我国大豆出油率在16%~17%。同时我国大豆品质的另一缺陷是专用性不强,目前我国培育的大豆品种是蛋白质和高出油率混用品种,而国外培育的多是高蛋白质或高含油率的专用品种。

转基因大豆大部分用于榨油,据估计我国80%~90%的大豆油是用转基因大豆加工而成^[18]。主要原因包括:1)安全性。油中转基因成分微量,基因主要存在于大豆蛋白中,包括转基因大豆普遍种植的美国也很少使用转基因大豆直接加工成食品和大豆蛋白。我国2007年进口大豆3082万t,100%用于榨油^[13];2)利润。由于转基因大豆价格低廉、出油率高,利润较高,对于油脂企业来说具有很大的诱惑;3)可利用性。转基因大豆不仅可以作为油料资源,同时制油后的饼粕又是发展我国饲养业的优质蛋白资源。

进口大豆几乎全部是转基因大豆,从食品安全考虑适宜用于榨制豆油,而国产大豆的主要用途不再是榨油,而是直接用于食品加工领域。可见国产大豆与进口大豆在加工用途上已经明显分化。

3 不同加工过程对转基因大豆内、外源DNA降解的影响

原料经过若干道加工工序(如热、压力、酸碱和酶解等物理、化学或生物处理),理化性质发生变化,使DNA产生一定的降解^[21]。英国利兹(Leeds)大学研究表明,加工工艺可使某些转入的外源DNA断裂,当外源DNA片段小于单个基因大小时,物质就不可能通过其遗传而生存。因此,转基因食物经加工、烹调后,DNA的完整性、维持的时间及生物学活性值得关注。

一个功能性的基因要想从转基因植物转移到细菌中需要达到250bp以上^[22]。因此,不仅要关心产品及副产品中是否含有转基因成分,而且也必须知道外源基因片段在加工过程中长度的变化规律。

3.1 转基因大豆加工品

近几年来国内外一些学者开始研究不同加工环节内外源基因的变化规律。对于一些传统的豆制品,如豆腐、豆粉、豆奶等,主要是研究磨浆、煮浆等简单的物理、化学加工过程。Bauer等^[23]研究发现在豆奶和豆腐中可检测到1339bp片段。对于转基因大豆制成的豆奶和豆腐,生豆奶煮沸10min,基因片段从1714bp降到1339bp,而在豆腐中并未发现进一步的DNA降解。陈颖等^[24]研究发现豆腐、豆奶、豆粉不同加工工艺对DNA的降解影响不同,终产品的DNA片段大小也不尽相同。物理过程如磨浆等能使大豆凝集素(Lectin)基因长度降解至原来的一半(约1000bp左右);高温煮浆处理DNA片段并未受到破坏,但更高温度及更长时间的杀菌使豆奶及豆粉中Lectin片段大小仅为400bp以下;蛋白质变性过程同时也是DNA降解加剧的过程,豆腐的蛋白质变性使Lectin片段从800bp降至200~400bp左右,这与Bauer结论有所不同。梁杉等^[25]用高压蒸汽处理豆粕,研究发现其对启动子基因和终止子基因的影响明显不同,启动子基因均可检测到246、165bp和101bp这3个处理后的片段,而终止子基因只能检测到125bp片段,217bp片段在处理后的检测不到,这与陈颖等^[26]报道相反。Peano等^[27]研究了豆粉、薄脆饼干和豆腐中内源大豆Lectin的降解情况,在豆粉中能够检测出1626bp的该基因片段,薄脆饼干和豆腐中只能分别检测出391bp和169bp。梁克红^[28]研究豆粕进行干热、湿热、膨化处理后外源基因片段的降解情况。外源基因片段随温度的升高、加热时间的延长,降解更严重,经过120℃干热10min后,降解到408bp以下;高压对外源基因片段造成了严重的破坏,湿热1min,外源基因降解到807bp以下;膨化处理对外源基因的影响不大,膨化以后外源基因降解到1512bp以下。Debode等^[29]将转基因大豆粉分别进行微波、加热、超声波破碎、高压蒸汽处理,荧光定量PCR定量检测内源及外源成分发现,物理处理导致Ct值(每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数)的增加,即DNA含量减少。但最终的 ΔCt 值并没有改变,即物理处理不会减少转基因成分的相对含量,同时也发现物理处理很难使DNA降解到100bp以下。Murray等^[30]也利用Real-time PCR定量检测实验室模拟豆腐加工过程中DNA的降解变化,对各加工工序点内外源基因成分进行绝对定量。Yoshimura等^[31-32]根据其实验加工过程,设计不同引物扩增比较研究发现,扩增RRS结构特异性基因101bp片段

和 121bp 片段,与扩增的内源基因 Lectin 长度(118bp)相似,最适合定量检测转基因大豆加工品。

对于大豆蛋白、大豆油、酱油等大豆的深加工品, DNA 降解程度较大, DNA 最终降解到什么程度需更深入的认识,这对 DNA 高效提取及检测技术灵敏度提出了更高的要求。Bauer 等^[23]研究大豆深加工蛋白质 DNA 降解情况,发现其能扩增到 714bp 片段。Vijayakumar 等^[33]模拟加工过程,通过加热、高压灭菌、微波等加工环节转基因成分的检测, DNA 的完整性、回收率和 PCR 扩增片段长度(< 200bp)是影响转基因成分定量检测的主要因素。转基因大豆作为原料提取大豆油已成为现今转基因大豆主要用途之一。但大豆油中 DNA 含量较少,降解程度较大,使定性定量检测产生一定困难。Grysona 等^[34]在实验室模拟了大豆油的精炼过程,并且在大豆毛油中检测到转基因成分。Patrizia 等^[35]利用基于 DNA 的传统方法和 DNA 生物传感器能监测转基因大豆油加工链各个环节转基因成分情况。王小花^[36]对大豆毛油精练成精炼油过程中的 4 道重要的工序进行采样,用 Taqman 探针 PCR 检测每个样品的 Lectin 基因和 CaMV 35S 启动子基因,建立了可靠的 DNA 提取技术和大豆油中转基因成分的检测方法。

转基因大豆经过加工后, DNA 发生降解,在深加工品中外源成分基因片段长度甚至小于 200bp,但降解到小于 100bp 的可能性很小,相关监管部门可选择合适的片段长短进行检测。同时,不同加工过程中大豆 DNA 降解程度差别较大,因此对于转基因成分的检测,特别是定量检测,可根据不同的加工品采用不同的方法。

3.2 含有转基因大豆成分的加工品

国外已有转基因大豆加工品进入到食物链中。如 Fábio 等^[37]对巴西市场上含大豆蛋白质的肉制品添加剂进行研究,在 32 个食品添加剂样本中, 25 个样本检测到 Lectin 基因 164bp 片段, 15 个样本中检测到抗草甘膦大豆的特异基因 169bp 片段;在 8 种肉制品中检测到 Lectin 基因, 3 种检测到抗草甘膦大豆特异基因。Taski-Ajdukovic 等^[38]在塞尔维亚市场上销售的 51 种肉制品中,发现其中 12 种可检测到 35S 启动子的 195bp 片段,并利用 Real-time PCR 对阳性品进行定量检测。Cardarelli 等^[39]在检测市场大豆产品及可能含有大豆成分的加工品中, 6 种香肠产品中 2 种存在 RR 大豆 DNA 成分。Greiner 等^[40]抽查的 100 个样品中 21% 含有转基因成分,其中 3 种大豆分离蛋白中就有一种检测出含外源基因。Ujhelyi 等^[41]调查匈牙利市场 21 种肉制品,均检测到 Lectin 基因,同时定量检测外源基因发现其中 5 种样品转基因成分含量大于 5%, 3 种样品转基因成分含量在 0.9%~5% 之间, 4 种样品转基因成分含量小于 0.1%。RR 大豆的

大豆蛋白已作为食品成分在加工肉制品中商业化应用,对肉制品的安全性提出了新的挑战。因此有必要摸清转基因大豆加工品中外源成分的情况,为其进入下游食物链的溯源追踪做好准备。

在转基因大豆及其加工品进入食品市场后,许多国家已开始对转基因食品进行标识和追溯。但转基因大豆在加工过程中 DNA 会发生不同程度的降解,这对转基因成分的检测提出更高的要求。因此,了解大豆加工品中 DNA 的降解程度及其外源成分含量,以及不同加工工艺对 DNA 降解程度的影响,对转基因加工品的检测有重要的作用,能提供转基因作物在我国食物链中加工及流通环节的相关信息,对于转基因食品安全的检测监控及其追溯均有十分重要的意义。

4 展 望

转基因大豆已进入食物链,其安全性越来越受到关注,不仅要考虑大豆及其加工品的转基因成分,还要考虑其在加工过程中的变化以及基因组 DNA 降解后造成的影响,开展主要加工工艺对转基因大豆 DNA 片段大小及含量的影响研究,全面研究转基因大豆不同加工过程内外源基因的变化情况。

在加工过程中,转基因大豆不同 DNA 片段降解程度不同,不同加工过程中转基因大豆 DNA 降解程度也不同,国内外学者的研究结果对此存在争议,仍有必要进一步深入研究,这对于转基因产品定性定量检测时根据不同加工品 DNA 片段的降解程度,设计大小适合的扩增引物具有非常重要的意义。

随着国产大豆的紧缺,转基因大豆占据我国市场,国内火腿肠生产企业不得不从美国、日本进口大豆及大豆粉,由于美国大豆主要是转基因大豆,转基因大豆很有可能进入到下游食物链中,食品受转基因成分污染的可能性很大。因此,深入研究转基因大豆加工过程 DNA 降解变化,确定转基因大豆加工品中转基因成分的含量及降解程度,根据加工过程每一个加工环节 DNA 情况,满足食品加工链中溯源需要,并作为进行转基因食品标识与追溯环节监控的基础工作。同时转基因大豆加工品加工过程 DNA 降解情况的分析,为其进入食物链下游产品(如西式肉制品等)打好基础,提供转基因大豆成分在我国食品链中加工及流通环节的信息,为转基因成分的标识与追溯提供依据,确保“从农田到餐桌”全程将转基因大豆与非转基因大豆加工品分开和标识。

参考文献:

- [1] JAMES C. Global status of transgenic crops in 1997[R]. Ithaca, NY: ISAAA, 1997: 5.

- [2] JAMES C. Global review of commercialized transgenic crops: 1998[R]. Ithaca, NY: ISAAA, 1998: 8.
- [3] JAMES C. Global review of commercialized transgenic crops: 1999[R]. Ithaca, NY: ISAAA, 1999: 17.
- [4] JAMES C. Global review of commercialized transgenic crops: 2000[R]. Ithaca, NY: ISAAA, 2000: 23.
- [5] JAMES C. Global review of commercialized transgenic crops: 2001[R]. Ithaca, NY: ISAAA, 2001: 24.
- [6] JAMES C. Global status of commercialized transgenic crops: 2002[R]. Ithaca, NY: ISAAA, 2002: 29.
- [7] JAMES C. Global status of commercialized transgenic crops: 2003[R]. Ithaca, NY: ISAAA, 2003: 30.
- [8] JAMES C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2004 [R]. Ithaca, NY: ISAAA, 2004: 32.
- [9] JAMES C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2008 [R]. Ithaca, NY: ISAAA, 2008: 39.
- [10] 沈晓峰, 梁凤侠, 陶波. 抗草甘膦转基因大豆生物与环境安全性[J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(3): 401-404.
- [11] Monsanto Company. Safety assessment of roundup ready soybean event [EB/OL]. (2002-09)[2009-10-15]. http://www.monsanto.com/monsanto/content/products/productivity/roundup/soybean_pss.pdf.
- [12] AGBIOS. Database product description: GTS40-3-2[EB/OL]. (2002-09)[2009-10-15]. <http://www.agbios.com/dbase.php?action=ShowProd&data=GTS+40-3-2&format=LONG>.
- [13] 万宝瑞. 中国大豆产业的发展思路[J]. 中国食物与营养, 2009(1): 8-10.
- [14] GNMET R, GIFFORD F. Plant biotechnology in the United States issues and challenges enroute to commercial production[J]. Hortscience, 1998, 32(2): 187-191.
- [15] BARABARA E. Buried data in Monsanto's study on round up ready soybean, whole life time[EB/OL]. (2000-08)[2009-11-01]. http://www.biotech-info.net/buried_data.html.
- [16] HARDELL L, ERIKSSON M. New study links world's biggest selling pesticides to cancer, Swedish study finds exposure to glyphosate and MCPA increases risk for nonhodgkin's lymphoma[EB/OL]. (1999-06-21)[2009-11-01]. http://www.biotech-info.net/glyphosate_cancer2.html.
- [17] BENBROOK C M. Troubled times amid commercial success for roundup ready soybeans: glyphosate efficacy is slipping and unstable transgene expression erodes plant defenses and yields[EB/OL]. (2001-08)[2009-11-01]. <http://www.mindfully.org/GE/GE2/RRS-Troubled-Benbrook.htm>.
- [18] 叶增民, 潘婕. 转基因大豆及其制品的安全性研究现状[J]. 生物技术通讯, 2009(2): 26-28.
- [19] 张兴敏, 于洪敏, 魏健, 等. 转基因食品中外源 DNA 降解和代谢的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2008, 10(1): 52-57.
- [20] 庾晋. 进口大豆对国内市场影响[J]. 西部粮油科技, 2003(6): 3-4.
- [21] 郑文杰, 刘炬, 刘伟, 等. 转基因大豆加工产品的定性 PCR 检测[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(5): 467-471.
- [22] 梁克红, 李俊, 李军国. 转基因饲料 DNA 在加工过程中的降解研究进展[J]. 饲料工业, 2008, 29(8): 51-53.
- [23] BAUER T, WELLER P, HAMMES W P, et al. The effect of processing parameters on DNA degradation in food[J]. European Food Research and Technology, 2003, 217(4): 338-343.
- [24] 陈颖, 王媛, 徐宝梁, 等. 食品加工工艺对大豆内源基因降解变化规律的影响[J]. 中国粮油学报, 2005, 20(4): 60-64.
- [25] 梁杉, 梁宁, 蒋继志, 等. 转基因豆粕调控元件在饲料加工中降解变化的初步研究[J]. 华北农学报, 2009, 24(2): 201-205.
- [26] 陈颖, 王媛, 葛毅强, 等. 转基因大豆 Roundup Ready 调控元件在食品加工过程中降解变化的研究[J]. 中国食品卫生, 2005, 27(2): 135-139.
- [27] PEANO C, SAMSON M C, PALMIERI L, et al. Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO foodstuffs with four different extraction methods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(23): 6962-6968.
- [28] 梁克红. 饲料加工工艺对大豆转基因成分影响规律的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.
- [29] DEBODE F, JANSSEN E, BERBEN G. Physical degradation of genomic DNA of soybean flows does not impair relative quantification of its transgenic content[J]. Eur Food Res Technol, 2007, 226(1): 273-280.
- [30] MURRAY B, BUTLER C, GAIL M. Quantitative real-time PCR assay to detect DNA degradation in soy-based food products[J]. J Sci Food Agric, 2009, 89(7): 1137-1144.
- [31] YOSHIMURA T, KURIBARA H, KODAMA T, et al. Comparative studies of the quantification of genetically modified organisms in foods processed from maize and soya using real time PCR[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(6): 2060-2069.
- [32] YOSHIMURA T, KURIBARA H, MATSUOKA T, et al. Applicability of the quantification of genetically modified organisms to foods processed from maize and soy[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(6): 2052-2059.
- [33] VIJAYAKUMAR K R, MARTIN A, GOWDA L R, et al. Detection of genetically modified soya and maize: impact of heat processing[J]. Food Chemistry, 2009, 117(3): 514-521.
- [34] GRYSO N, RONSSEB F, MESSENSA K, et al. Detection of DNA during the refining of soybean oil[J]. JAOCs, 2002, 79(2): 171-174.
- [35] PATRIZIA B, MARIA M, MARIA M S, et al. Transgenes monitoring in an industrial soybean processing chain by DNA-based conventional approaches and biosensors[J]. Food Chemistry, 2009, 113(2): 658-664.
- [36] 王小花. 食品中抗草甘膦转基因大豆实时PCR检测方法的建立与应用[D]. 苏州: 苏州大学, 2009.
- [37] FÁBIO C, BROD A, ANA C M, et al. Recombinant DNA in meat additives: specific detection of Roundup Ready™ soybean by nested PCR[J]. J Sci Food Agric, 2007, 87(10): 1980-1984.
- [38] TASKI-AJDUKOVIC K, NIKOLIC Z, VUJAKOVIC M, et al. Detection of genetically modified organisms in processed meat products on Serbian food market[J]. Meat Science, 2009, 81(1): 230-232.
- [39] CARDARELLI P, BRANQUINHO M R, FERREIRA R T B, et al. Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience[J]. Food Control, 2005, 16(10): 859-866.
- [40] GREINER R, KONIETZNY U, VILLAVICENCIO A L C H. Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods[J]. Food Control, 2005, 16(8): 753-759.
- [41] UJHELYI G, VAJDA B, BÉKI E, et al. Surveying the RR soy content of commercially available food products in Hungary[J]. Food Control, 2008, 19(10): 967-973.