

溶菌酶及其在肉制品保鲜中的应用

王 燧¹ 郭淑珍^{1,2} 张淑芹³

(1、四川农业大学 农产品加工及贮藏工程省级重点实验室 四川雅安 625014

2、中国农业科学院 农产品加工研究所 北京 100094

3、青岛商务学校 山东青岛 266002)

摘 要: 溶菌酶是一类安全无毒的碱性蛋白质,作为天然防腐剂广泛用于食品工业中。肉类食品因其含有丰富的营养物质,极易受到微生物的侵害。综述了溶菌酶的发现、种类、理化特性、抑菌机理及其在肉制品贮藏保鲜方面的应用,证明溶菌酶是一种有效的肉类防腐保鲜剂。

关键词: 溶菌酶; 肉制品; 抑菌; 天然防腐剂

Abstract: Lysozyme is safe and innocuous protein, so it is applied in the food industry widely as natural preservative. Because the meat product have abundant nutriment, it is liable to invade by microorganism. This paper is given a summary on the finding, kind, physical and chemic character, inhibition mechanism of lysozyme and its application on storage and keeping fresh of meat product. It is proved that the lysozyme is effective natural preservative.

Key words: Lysozyme; Meat product; Inhibition; Natural preservative

前 言

溶菌酶 (Lysozyme, LZM) 又称胞壁质酶或 N-乙酰胞壁质水解酶, 是一种专一的作用于微生物细胞壁的水解酶, 而对其它成分没有影响。由于 LZM 的作用底物特异性强, 因此作为一种安全有效的防腐抑菌剂广泛应用于食品、医药、生物工程等领域。目前发现, LZM 存在于大多数的动植物体内, 某些微生物也能产生 LZM。肉制品因其含有丰富的营养物质, 容易受到微生物的污染, 导致商品的货架期缩短。而目前使用的一些化学防腐

剂, 都或多或少破坏食品原有风味且对人体健康不利, 因此寻找一种安全有效的天然防腐保鲜剂意义重大。近年来, 许多研究都表明 LZM 是一种理想的肉制品防腐保鲜剂。

1 LZM 的发现

溶菌酶的研究最早起源于尼科尔(1907)发现枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的溶解因子以及拉希琴科(1909)关于“鸡蛋清的强抑菌作用是由于酶的作用”的论断。1922年, 英国细菌学家弗莱明发现, 人的鼻涕、唾液、眼泪等也有溶菌性并将其溶菌作用因子命名为 lysozyme。此后, 人们开始对溶菌酶进行深入研究, 并不断有新的进展。1959~1963年, 索尔顿等人通过大量研究指出溶菌酶能够切断 N-乙酰胞壁酸 (NAM) 和 N-乙酰氨基葡萄糖 (NAG) 之间的 $\beta-1, 4$ -糖苷键。1963年, 乔利斯和坎菲尔德研究了 LZM 的一级结构。1965年, 菲利普等发表了对鸡蛋清溶菌酶 (HEWL) X-射线衍射的研究报告, 使溶菌酶成为世界上首个弄清其立体结构的酶。所有的溶菌酶中, HEWL 是研究最为透彻的, 在蛋白质结构数据库中有将近 150 种不同的 X-射线衍射结构, 对其进行的 NMR 研究也超过 200 项^[1]。由于 HEWL 的一级结构和三维结构都已了解的很清楚, 所以常作为研究蛋白质结构和功能的模型^[2-3]。

2 LZM 的来源及种类

按照不同的来源, 溶菌酶可以分为动物源溶菌酶、植物源溶菌酶、微生物源溶菌酶等;

按照作用对象的不同, 又分为细菌溶菌酶和真菌溶菌酶。

2.1 动物源性溶菌酶

这类溶菌酶主要包括：HEWL、其它鸟类蛋清溶菌酶、人溶菌酶及哺乳动物溶菌酶等。

HEWL 是溶菌酶的典型代表，也是目前了解最清楚的一种溶菌酶。它由 129 个氨基酸残基组成，其分子量为 14KDa；除了鸡蛋清外，溶菌酶也在火鸡、珍珠鸡、鹌鹑等鸟类的蛋清中被发现，其性质与 HEWL 相似；人溶菌酶存在于眼泪、唾液、鼻粘液、乳汁等分泌液中，1ml 眼泪中含 7mg 溶菌酶，1ml 乳汁中含 0.1~0.5mg 溶菌酶。人溶菌酶由 130 个氨基酸残基组成，分子量为 14.6KDa，其溶菌活性比 HEWL 高 3 倍；对于哺乳动物溶菌酶，目前仅从牛、马、羊等动物的乳汁中分离出，其化学性质与人溶菌酶相似，但结构尚不清楚，其溶菌活性也远低于人溶菌酶约 3000 倍。

2.2 植物源性溶菌酶

目前已从木瓜、无花果、芜菁、大麦等植物中分离出溶菌酶，其分子量较大，约为 24KDa~29KDa，其溶菌活性比 HEWL 低。

2.3 微生物源性溶菌酶

目前，微生物产生的溶菌酶可分为以下几类：① 内-N-乙酰己糖胺酶，此酶可破坏细菌细胞壁肽聚糖中的 β -1,4-糖苷键。② 酰胺酶，能切断细菌细胞壁肽聚糖中 NAM 与肽“尾”之间的 N-乙酰胞壁酶-L-丙氨酸键。③ 内肽酶，使肽“尾”及肽“桥”内的肽键断裂。④ β -1,3、 β -1,6-葡聚糖和甘露聚糖酶(葡甘露糖酶)，此酶分解酵母细胞的细胞壁。⑤ 壳多糖酶(几丁质酶)：分解霉菌细胞壁。⑥ 磷酸甘露糖酶：与葡甘露糖酶共同作用，能分解原生质。⑦ 脱乙酰壳多糖酶：主要分解霉菌中的毛霉和根霉。

3 LZM 的理化特性

在所有的溶菌酶中，HEWL 是理化性质最清楚的一种溶菌酶。其纯品为白色粉状晶体，无臭、微甜，易溶于水和盐溶液，不溶于丙酮、乙醚，最适温度为 50℃，最适 pH 值为 6~7。它约占鸡蛋清蛋白的 3.4~3.5%^[4]。HEWL 在酸溶液和醇溶液中稳定性较好，如在酸性条件下，加热至 55℃ 活性无变化；在 15% 和 20.5% 乙醇溶液中，62.5℃ 下可以分别维持 30min 和 20min 不失活，而在碱性条件下耐热性较差^[5]。

4 LZM 的抑菌机理及抑菌谱

细菌细胞壁的基本骨架为肽聚糖层，由 NAM、

NAG 以及一些氨基酸组成。NAM 和 MAG 之间通过 β -1,4-糖苷键连接。溶菌酶则可以专一的水解 β -1,4-糖苷键，使细菌的细胞壁破裂，从而导致细菌死亡。目前的研究发现^[6-7]，溶菌酶对 G⁺ 细菌的抑菌效果较好，而对于 G⁻ 细菌则几乎无作用。这可能与两者细胞壁的结构不同有关。G⁺ 细菌的细胞壁几乎全部由肽聚糖组成，而 G⁻ 细菌的细胞壁只有内壁层为肽聚糖^[8]。Masschalck (2003)^[9]指出，可以通过对溶菌酶进行变性、多聚糖的共价结合、基因修饰、外膜渗透剂(EDTA、聚阳离子等)处理、高压静力处理等方法扩大溶菌酶的抑菌谱。

5 LZM 在肉制品贮藏保鲜中的应用

5.1 LZM 在冷却肉保鲜中的应用

冷却肉是指严格执行检疫制度，将宰杀后的畜胴体迅速冷却，排除体内的热量，使胴体温度降为 0~4℃，并在后续的加工流通和分销过程中始终保持 0~4℃ 冷藏的生鲜肉^[14]。冷却肉与热鲜肉相比，因大多数微生物在低温下受到抑制而更加卫生；与 -18℃ 保存的冷却肉相比，又具有汁液流失少、营养价值高等特点，成为肉制品消费的“新宠儿”。但由于冷却肉 0~4℃ 下保存，一些嗜冷菌仍能生长繁殖。

近年来，许多学者对溶菌酶单独使用或复配使用保鲜冷却肉进行了研究，旨在抑制肉中的腐败菌，延长其货架期。马美湖等(2003)^[10]使用溶菌酶、Nisin、GNa 液对冷却肉进行保鲜试验。结果表明：在单独使用时，溶菌酶的保鲜效果明显优于对照组和 GNa 液组，也略优于 Nisin 组。张德权等(2006)^[11]选取 Nisin、溶菌酶、乳酸钠、茶多酚、壳聚糖等 5 种天然保鲜剂对冷却羊肉进行保鲜处理，结果发现溶菌酶的保鲜效果优于乳酸钠、茶多酚、壳聚糖。马美湖(2005)等^[12]还通过正交试验，利用溶菌酶、Nisin、山梨酸钾对冷却肉进行保鲜试验。结果表明：当浓度为 0.25% 的 Nisin，浓度为 0.25% 的溶菌酶和 0.2% 的山梨酸钾在 pH4.5 复配时，保鲜效果最好。顾仁勇等(2002)^[13]研究发现：0.05% Nisin+0.05% 溶菌酶混合液能有效延长猪肉的保鲜期，结合真空包装技术则保鲜效果更好。张德权等(2006)还^[14]使用 Nisin、溶菌酶、乳酸钠复配对冷却羊肉进行保鲜试验。结果表明：复合保鲜剂的最佳配比为 Nisin0.34%、溶菌酶 0.24%、乳酸钠 2.27%。

5.2 LZM 在低温肉制品中的应用

近年来,食品安全与营养成为人们关注的焦点。低温肉制品由于其采用了低温杀菌工艺,避免了高温杀菌时对肉制品风味和营养的破坏,是一类前景看好的高档肉制品。但低温杀菌并不能完全抑制微生物的生长,故其货架期较短,这也影响了此类肉制品的进一步推广。因此采用天然无毒的防腐剂延长其货架期具有重要意义。曾友明等(2002)^[15]发现单独使用溶菌酶或 Nisin 对盐水方腿进行了保鲜时,效果并不理想。而采用两者与复合磷酸盐、茶多酚、酪氨酸钠复配物复配后可使盐水方腿的保存期达三个月以上。

5.3 LZM 在红肠保鲜中的应用

红肠又叫哈尔滨红肠、里道斯红肠,因其肠体呈枣红色而得名,原产于东欧,19世纪末传入我国东北地区。它是一种高营养的肉制品,深受消费者喜爱,但其贮存时极易腐败,尤其是夏季仅能存放1~2天。林琳等(2003)^[16]采用四种防腐剂保鲜红肠。结果表明:当以0.2%的山梨酸钾、4%的乳酸钠、0.04%的溶菌酶和0.05%Nisin复配时效果最好,且对红肠品质基本无影响。

5.4 LZM 在火腿和腊肠保鲜中的应用

国外有学者使用复配防腐剂对火腿和腊肠进行了保鲜试验。Gill(2000)^[17]向博洛尼亚腊肠和火腿中添加500mg/kg的(lysozyme:Nisin=1:3)和500mg/kg的EDTA。同时以热沙索丝菌、大肠杆菌、沙克乳杆菌、弯曲乳杆菌、肠膜状明串珠菌、单增李斯特菌、伤寒沙门氏菌、格氏沙雷氏菌、腐败希瓦氏菌等九种菌作为指示菌分别添加到火腿和腊肠中,真空包装于8℃贮藏4周。结果发现单增李斯特菌(2周内)、伤寒沙门氏菌(2周内)、大肠杆菌(4周内)等致病菌均受到明显抑制。Gill(2003)^[18]还探讨了溶菌酶与Nisin、EDTA、NaCl、NaNO₂之间的抑菌交互作用,为生产博洛尼亚火腿和腊肠保鲜剂奠定基础。

5.5 LZM 在鲜肉保鲜中的应用

鲜肉作为人们补充蛋白质的重要来源,仍然是消费的主力军。但是鲜肉因其含有丰富的营养成分,在常温下贮存容易腐败变质。国内还未见关于溶菌酶作为保鲜剂对鲜肉进行研究的报道。Nattress(2001)^[19]进行了这方面的研究,结果发现:无论是脂肪组织还是瘦肉组织,溶菌酶与Nisin复

配使用的抑菌效果都好于溶菌酶或Nisin单独使用。

6 展望

溶菌酶作为一种安全有效的天然防腐抑菌剂已被成功的应用于各个方面。溶菌酶单独使用的抑菌并不理想,而与其他防腐剂复配后抑菌效果大大增强,可能是复配后溶菌酶的抑菌谱被拓宽。应注意的是,溶菌酶作为一种碱性蛋白质,有一定的最适温度和最适pH,在使用时需结合其理化性质,避免出现酶失活。

综上所述,笔者认为可以加强以下几方面的工作:①由于溶菌酶的用途极其广泛,而目前为止仅HEWL成功商业化,其他溶菌酶的性质仍不清楚,极大的限制了其应用。所以应继续深入研究除HEWL外的其他溶菌酶,扩大商业化溶菌酶的来源。②根据溶菌酶的抑菌机理,它对G⁺细菌的抑菌效果显著好于G⁻细菌,因此可以通过基因工程的手段改良溶菌酶的某些基因,生产抑菌谱较宽的溶菌酶。③目前,溶菌酶在肉制品保鲜中的应用研究还不是很多。特别是较多报道集中在对冷却猪肉、羊肉的保鲜,而其他的畜禽肉却鲜见报道,建议扩大研究的畜禽肉种类。④已经证实许多微生物可以产生溶菌酶,建议开展产广谱溶菌酶菌株的筛选,以降低溶菌酶的使用成本。

参考文献

- [1] Wang Y, Trent C, Wishart B D S. Complete 1H and non-calcobnylie 13C assignments of native hen egg white lysozyme [J]. Journal of Biomolecular NMR, 2000(17): 83~84.
- [2] Vaintranb I A, Morari D. Appling the increase in rate constants of cooperative proteolysis to the determination of transition curves of protein denaturation[J]. J. Biochem. Biophys. Methods 2003(57): 191~201.
- [3] Yasushige Y, Shinpei T, Tomomi K, et al. An insight into the pathway of the amyloid fibril formation of hen egg white lysozyme obtained from a small-angle X-ray and neutron scattering study[J]. J. Mol. Biol, 2002(323): 237~251.
- [4] Kamalreokh Z M, Stanislaus F D S. Enhancement in the lysozyme activity of the hen egg white foam matrix by cross-linking in the presence of N-acetyl glucosamine[J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 1999(39): 115~117.