

溶菌酶及其在肉制品加工中的应用

■ 康怀彬 张 敏 宗留香 (河南科技大学食品与生物工程学院 洛阳 471003)

摘 要 本文综述了溶菌酶的结构、性质、来源、分离纯化方法和作用机理,概括了其在肉制品加工中的应用现状、使用方法及注意事项,展望了其发展前景。

关键词 溶菌酶 肉制品 防腐剂 应用

1. 前言

食品在保藏过程中极易受微生物侵袭而导致腐败变质,采用防腐剂抑制微生物。延缓腐败是当今食品保鲜的重要技术之一。但目前大多数防腐剂为化学防腐剂,而化学防腐剂的安全性越来越引起人们的担忧,对其应用越来越受到众多国家限制。因此,寻找高效、安全、适用性广、性能稳定的天然防腐剂已成为食品研究领域的一个热点。溶菌酶作为一种既安全又有效的天然防腐剂,已引起人们的普遍关注,现已广泛应用于食品保鲜、防腐。

溶菌酶(Lysozyme,EC3.2.1.17)又称胞壁质酶,化学名称为N-乙酰胞壁质聚糖水解酶,是一种专门作用于微生物细胞壁的水解酶。人们对溶菌酶的研究始于上世纪初,1922年英国细菌学家Fleming发现人的唾液、眼泪中存在有溶解细菌细胞壁的酶,因其具有溶菌作用,故命名为溶菌酶[1]。随着研究的深入,发现溶菌酶广泛存在于鸟类、家禽的蛋清中以及哺乳动物的眼泪、唾液、乳汁、血液、白细胞、胎盘以及淋巴液、肝肾组织细胞中;一些植物如番木瓜、凤梨、无花果鲜汁中和微生物细胞内也存在溶菌酶。其中蛋清中含量最丰富(3.5%),多数商品溶菌酶是从蛋清中提取纯化的[2]。作为一种存在于人体正常体液及组织中的非特异性免疫因素,溶菌酶对人体安全无

毒、无副作用,且具有多种药理作用,具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤的功效[3],所以是一种无毒、无害、安全性很高的天然防腐剂,溶菌酶既是一种无毒、无副作用的蛋白质,又具有溶菌作用,因此可作为食品防腐剂。溶菌酶作用食品防腐剂已在乳制品、肉制品、水产品、饮料、清酒、糕点、生鲜面条、果蔬制品等食品中被使用[4~7]。

2. 溶菌酶的来源、种类及提取纯化方法

2.1 溶菌酶的来源、种类

溶菌酶按其来源不同可分为动物源溶菌酶、植物源溶菌酶、微生物源溶菌酶等。

2.1.1 动物源溶菌酶

人和哺乳动物的乳汁和体液中都含有溶菌酶。人初乳、血清、眼泪中溶菌酶含量分别为40mg/100ml,0.6~1.0mg/100ml和700mg/100ml[8]。目前已从牛乳、马乳、羊乳中分离出溶菌酶,其物理、化学性质与人溶菌酶基本相似。

鸡蛋清溶菌酶是动物溶菌酶的典型代表,也是目前研究得最深最透的一类溶菌酶。蛋清中溶菌含量大约为2%~4%[9]。

2.1.2 植物源溶菌酶

目前已经从木瓜、无花果、芜菁、大麦、卷心菜等植物体内分离得到溶菌酶。此种酶对溶壁小球菌活性较鸡蛋清溶菌酶低,但其对胶体状甲壳质的分解活性则是鸡蛋清溶菌酶的10倍左右[9、10]。

2.1.3 微生物源溶菌酶

从60年代起,人们发现微生物也产生溶菌酶。目前发现的微生物溶菌酶大体有以下5种[3]。(1)内N-乙酰己糖胺酶,此酶类似于鸡蛋清溶菌酶;(2)酰胺酶,能切断细胞细胞壁肽聚糖中NAM与肽“尾”之间的N-乙酰胞壁酸-L-丙氨酰键;(3)内切酶,使肽“尾”及肽“桥”内的肽键断裂;(4) β -1,3和 β -1,6葡萄糖和甘露聚糖酶,此酶分解酵母细胞的细胞壁;(5)壳多糖酶,分解霉菌细胞壁。

细菌噬菌体也能产生溶菌酶,这是一种特异性的酶,由噬菌体的感染、诱导产生。目前由乳酸菌噬菌体所得的乳酸菌溶菌酶已被发现,在溶原菌中添加丝裂霉素C并用紫外线照射即可开始产生溶菌酶[8]。

按溶菌酶作用的微生物不同可将溶菌酶分为三大类,即细菌细胞壁溶解酶,酵母细胞壁溶解酶和霉菌细胞壁溶解酶。

2.2 溶菌酶的分离纯化方法

工业上生产的溶菌酶主要是水解糖苷酶型,多采用亲和色谱法、直接结晶法、离子交换法、超滤与亲和色谱联合使用法等提取、纯化[4]、[11]、[12]、[13]。

鸡蛋清中是提取溶菌酶的主要来源,我国常用鸡蛋壳中残留的蛋清为原料,在pH值6.5的条件下,用弱酸性大孔阳离子交换树脂吸附,再用硫酸铵洗脱,经过透析再冷冻干燥而成,得率为蛋清的0.1%。

3. 溶菌酶的分子结构及性质

鸡蛋清溶菌酶是一种碱性球蛋白,由129个氨基酸组成,具有4个S-S键,分子相对质量为14000[14]。人溶菌酶一级结构由130个氨基酸排列而成,分子量约14600,有4个二硫键,其一级结构氨基酸排列顺序及组成与鸡蛋清溶菌酶有极大的差异,但三级结构有相似性,酶活性为鸡蛋清溶菌酶的3倍。从牛、马等乳汁中分离出的溶菌酶,其一级结构、理化性质与人溶菌酶基本相似,但结构尚不清楚。植物溶菌酶分子量较大,如木瓜溶菌酶为24600,无花果溶菌酶为29100,芜菁溶菌酶为25000。

溶菌酶为白色结晶,无臭、味甜,易溶于稀盐水,在丙酮、乙醇作用下产生沉淀。溶菌酶化学性质非常稳定,最适pH为6~7,最适温度45~50℃,等电点高达10.7~11.0。溶菌酶受热后易失去活性,其水溶液加热至62.5℃并维持30min,则完全失活,

而15%乙醇溶液于62.5℃下维持30分钟不失活,20.5%的乙醇溶液在62.5℃下维持20分钟也不失活。但溶菌酶在酸性条件下却是稳定的,在pH3时,能耐100℃高温达45min[14]、[15];pH4.5时,加热100℃3min也不失活。在中性和碱性条件下耐热性差,如pH7时,100℃处理10min或80℃加热30min即失去活性[5]、[8]、[14]。

4. 溶菌酶的抑菌特性及作用机理

溶菌酶对革兰氏阳性菌、枯草杆菌、地衣型芽孢杆菌、好气性孢子形成菌等均有良好的抗菌作用,对大肠杆菌、普通变球菌和副溶血性弧菌等革兰氏阴性菌也有一定程度溶解作用,其最有效浓度为0.05%。溶菌作用的最适pH值为6~7,温度为45~50℃。

细菌的细胞壁由胞壁质组成,胞壁质是由N-乙酰氨基葡萄糖(NAG)及N-乙酰胞壁酸(NAM)交替组成的多聚物,胞壁酸残基上可以连接多肽,称为肽聚糖。多糖以直链形式存在,彼此邻近的多糖链之间可通过肽链部分相互连接,从而形成三维结构。溶菌酶专一性地作用于肽聚糖分子的NAM与NAG之间的 β -1,4糖苷键,使其断裂。这种多糖是细菌细胞壁的主要成分,经过溶菌酶作用后,就会损害细胞壁结构的完整性,使细菌细胞壁变得松弛,失去对细胞的保护作用,细胞因渗透压不平衡而引起破裂,从而导致菌体细胞溶解而死亡[15]、[16]。由于G⁺细胞与G⁻细胞,其细胞壁中肽聚糖含量不同,G⁺细胞细胞壁几乎全部由肽聚糖组成,而G⁻细胞只有内壁层为肽聚糖,因此,溶菌酶只能破坏G⁺细胞的细胞壁,而对G⁻细胞作用不大。

5. 溶菌酶在肉制品加工中的应用举例

溶菌酶是无毒的蛋白质,能选择性地使目标微生物细胞壁溶解而使其失去活性,而食品中的其他营养成分几乎不会造成任何损失。因此,它可以完全替代对人体健康有害的化学防腐剂(如苯甲酸及其钠盐)等,以达到延长食品保质期的目的[17]。

5.1 溶菌酶在冷却肉保鲜中的应用

冷却肉是肉类消费的发展方向,具有广阔的市场发展空间,但由于肉类冷藏所采用的温度(0~4℃),并不能彻底抑制微生物的生长繁殖及其他有关变化的发生,因此其保鲜期较短,无法满足市场流通的要求。近年来,国内许多学者将溶菌酶

应用于冷却肉的保鲜中,取得了满意的效果。傅伟昌等[18](2002)将0.5%的溶菌酶和18%NaCl、4.5%葡萄糖、0.5%Nisin组成复合保鲜剂,用于小包装分割冷却肉的保鲜,取得了满意的效果。顾仁勇等[19](2002)采用0.05%溶菌酶和0.05%Nisin混合液用于保鲜猪肉,有效延长了猪肉的保鲜期,4条件下猪肉可保鲜12d,若采用真空包装保鲜期可达24d。马美湖等[20][21]等(2003)研究了溶菌酶、Nisin、GNa液对冷却肉的保鲜效果,研究表明,溶菌酶单独使用时显著优于GNa,略优于Nisin,且溶菌酶对抑制细菌总数的增殖、减缓TVB-N值上升具有极其重要的作用。顾仁勇[22]等(2003)用溶菌酶(0.5%)、Nisin(0.05%)和山梨酸钾(0.1%)组成保鲜液(pH=3.0)处理冷却肉,真空包装后,0~4条件下,猪肉可保鲜30d以上。在上述研究的基础上,湖南农业大学成功开发出一种纯天然冷却肉保鲜剂(Hnsafety-008),使用该保鲜剂可以延长冷却肉保质期1~4倍[23]。

5.2 溶菌酶在红肠加工中的应用

红肠是北方传统的一种肉制品,属低温肉制品,由于其产品含水量较高,营养物质丰富,贮存与销售中极易腐败变质,保存期短,特别是夏季,仅能存放1~2d,为延长其货架期,杜琳等[24]等(2003)在红肠混合料斩拌时加入0.04%溶菌酶、0.05%Nisin、0.2%山梨酸钾和4%乳酸钠取得了满意的效果。

5.3 溶菌酶在低温及软包装肉制品加工中的应用

低温肉制品与高温肉制品相比,由于采用低温处理,产品保持了肉原有的组织结构和天然成分,营养素破坏少,具有营养丰富、口感嫩滑的特点,因此是今后肉制品的发展方向。但低温肉制品货架期短,为延长其货架期,曾友明等[25](2002)将溶菌酶与Nisin、复合磷酸盐、茶多酚、酪氨酸钠组成复合保鲜剂于滚揉过程中和原料肉混合,制成盐水方腿,其保质期可达3个月。湖南农业大学将研制开发的含有溶菌酶Hnsafety-010低温肉制品保鲜剂添加到原料肉中进行低温加热(80左右),可延长低温肉制品保鲜期一倍以上的时间[23]。张凤凯(2001)[23]在软包装肉制品真空包装前添加一定量的溶菌酶保鲜剂,然后巴氏杀菌(80~100,25~30min),可获得良好的杀菌效果,有效地延长小包装方便肉制品的货架期。

6. 肉制品加工中溶菌酶的使用方法及注意事项

6.1 使用方法

溶菌酶应用于冷却肉保鲜时,一般采用浸渍法和喷洒法。浸渍法是将溶菌酶等充分溶解于蒸馏水中后冷却至0~4,将分割肉块于浸泡液中浸泡3~5s,取出沥干真空包装后冷藏即可;喷洒法是将含有溶菌酶的保鲜剂配成浓度为1%~3%的喷洒液,喷洒在肉块表面,一般每千克溶液可喷洒200~300kg鲜肉。

加工香肠等肉糜类产品时,一般是将溶菌酶或含有溶菌酶的保鲜剂在斩拌时和原料肉混合,然后按特定的加工工艺加工成产品,加工西式火腿等低温肉制品时,常在滚揉时将保鲜剂和原料肉混合,然后按预定的加工工艺加工成产品。

6.2 注意事项

由于不同种类的溶菌酶其最适的作用条件不同,而且底物特异性强,因此,应用溶菌酶时,要充分掌握其酶学特性、食品中营养成分、pH、食盐浓度等影响溶菌酶效果的因素以及造成肉制品腐败的主要微生物类群,据此确定适当的添加量和使用方法。如溶菌酶作用的最适pH值为6~7,最适温度为45~50。

由于溶菌酶对革兰氏阴性菌抑菌效果不如革兰氏阳性菌,因此,为有效的发挥溶菌酶的防腐效力,可以考虑与其它物质配合使用。如将溶菌酶与甘氨酸、植酸、聚合磷酸盐等配合使用以增强对革兰氏阴性菌的溶菌作用。也可与Nisin等防腐剂混合使用。

由于溶菌酶受热后失去活性,因此肉制品加工时,应注意加热温度不要超过95,否则会影响其发挥活性,但溶菌酶在酸性条件下稳定,因此使用时应注意保鲜液的pH值。

7. 结语

溶菌酶作为一种天然蛋白质,能在胃肠内作用营养物质被消化和吸收,对人体无毒性,也不会体内残留,是一种安全性很高的食品保鲜剂、营养保健品和药品。因此,在倡导绿色食品消费的今天,溶菌酶这一天然防腐剂必定有广阔的应用前景。尽管目前由于其成本较高,未能广泛应用于肉制品加工中,但随着科技水平的不断发展和人们生活水平的不断提高,溶菌酶这一天然防腐剂一定会对食品工业的发展,起到不可估量的作用。

肉