

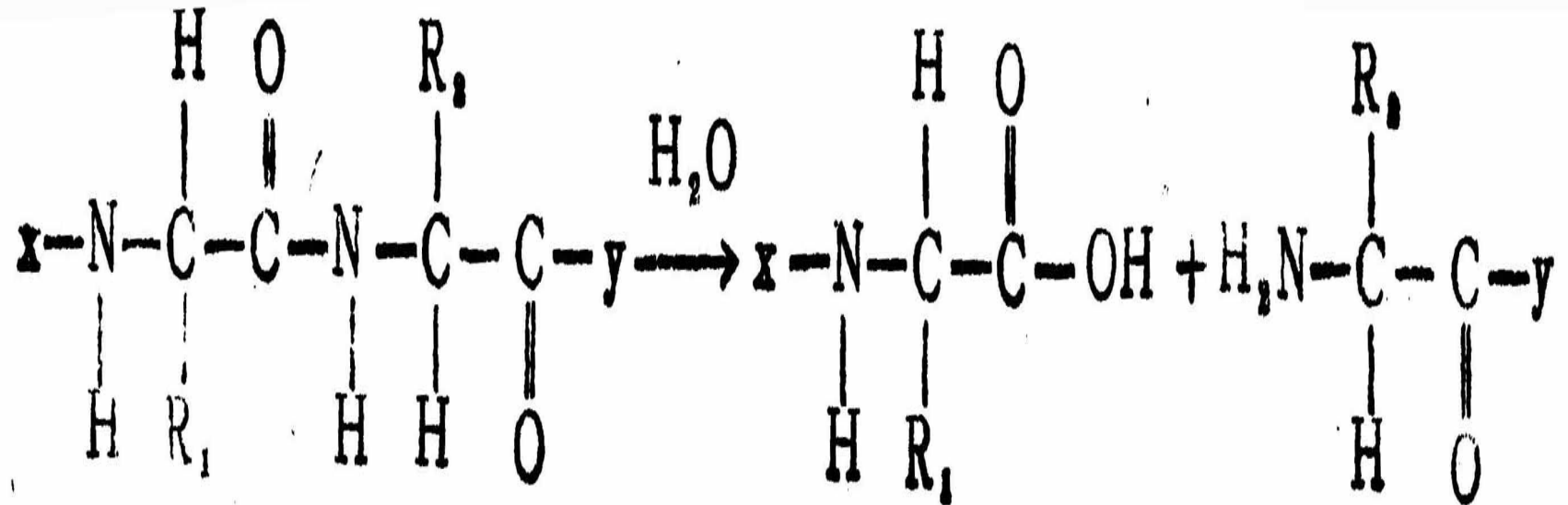
# 第 5 章 蛋白酶、溶 菌酶 ( 2 学时 )

主要内容：      5.1 蛋白酶  
                         5.2 溶菌酶

## 5.1 蛋白酶

- 蛋白酶是食品工业中最重要的一类酶。在干酪生产、肉类嫩化和植物蛋白质改性中都大量使用蛋白酶。人体消化道中存在的胃蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、羧肽酶和氨肽酶使人体摄入的蛋白质水解成小分子肽和氨基酸。

## 蛋白酶水解示意图:

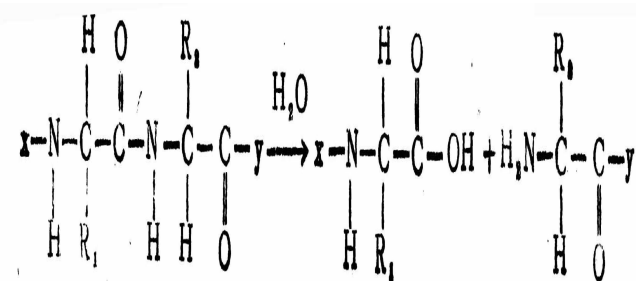


## 5.1.1 蛋白质的特异性要求

- 1、 $R_1$  和  $R_2$  基团的性质：

- 胰凝乳蛋白酶仅能水解  $R_1$  是酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸残基的侧链的肽键；胰蛋白酶仅能水解  $R_1$  是精氨酸或赖氨酸残基的侧链的肽键。

- 胃蛋白酶和羧肽酶对  $R_2$  基团具有特异性要求，如  $R_2$  是苯丙氨酸残基的侧链，那么这两种酶能以最高速度水解肽键。



- 2、氨基酸构型：

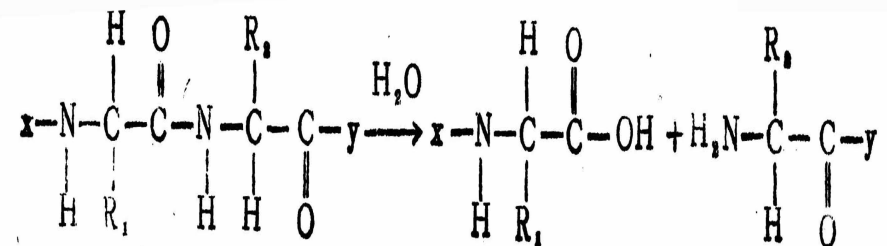
必须是 L 型的，天然蛋白质均属 L 型。

- 3、底物分子大小：

对于胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶，底物分子大小不重要，如前述

• 4、X 和 Y 性质：X、Y 可以是 -H、m-OH，也可以继续衍生出去。

- (1) 如果是肽链内切酶，在  $R_1$ 、 $R_2$  能满足特异性要求的前提下，肽链就能裂开，显然 X 和 Y 必须继续衍生出去，内切酶活力才表现出最高。X、Y 可以是氨基酸残基。
- (2) 对于肽链端解酶的羧肽酶，要求底物中 Y 是一个 -OH，其特异性对  $R_2$  有严格要求。在 X 不是 -H 时，可表现高活力。
- (3) 对于肽链端解酶的氨肽酶，要求底物中 X 是一个 -H，优先选择 Y 不是 -OH。特异性表现在 R 上。



- 5、对肽键的要求：

大多数蛋白酶不仅限于水解肽键，尚能作用于酰胺（ $-\text{NH}_2$ ）、酯（ $-\text{COOR}$ ）、硫羧酸酯（ $-\text{COS R}$ ）和异羟污酸（ $-\text{CONHOH}$ ）

胃蛋白酶和其它一些酸性蛋白酶对水解键有较高识别能力。如肽键 $\rightarrow$ 脂键，即使  $\text{R}_2$  满足要求也不能作为底物。

## 5.1.2 蛋白酶分类:

- 1、来源:

- (1) 植物: 菠萝、木瓜、无花果

- (2) 动物: 胃、胰蛋白酶、凝乳酶 (胃)

- (3) 微生物: 1398 枯草杆菌、3942 栖土曲霉蛋白酶、放线菌蛋白酶

- 2、最适作用条件:

- (1) 中性蛋白酶: pH6~8 1398 枯草杆菌、3942 栖土曲霉蛋白酶

- (2) 碱性蛋白酶: pH9~11 2709 枯草杆菌蛋白酶

- (3) 酸性蛋白酶: pH1~3 胃蛋白酶

- 3、根据对底物作用方式：

- ( 1 ) 内肽酶：产物为脘、胨、多肽、低肽

- ( 2 ) 外肽酶：羧肽酶：从以羧基末端

- 氨基肽酶：从氨基  
末端

- 4、根据酶活性部位：

- ( 1 ) 丝氨酸蛋白酶

- ( 2 ) 巯基蛋白酶（木瓜蛋白酶）

- ( 3 ) 金属蛋白酶

- ( 4 ) 酸性蛋白酶（凝乳蛋白酶）

## 5.1.3 木瓜蛋白酶:

- 其酶活性部位中含有巯基，属巯基蛋白酶。
  - 木瓜蛋白酶存在于木瓜汁液中，分子量 23900，至少有 3 个氨基酸残基存在于酶的活性部位，它们是 **Cys25**（半胱）、**His159**（组）和 **Asp158**（天冬）。当 **Cys25** 被氧化剂氧化或与重金属离子结合时，酶活力被抑制，而还原剂半胱氨酸（或亚硫酸盐）或 **EDTA** 能恢复酶的活力。还原剂作用：从  $-S-S- \longrightarrow -SH$ ，**EDTA** 螯合重金属离子。

- 木瓜蛋白酶在 pH5 时，有良好稳定性，如 pH<3 或 >11 时酶很快失活，最适 pH 随底物改变。
- 木瓜蛋白酶具有较高的耐热性，酶液在 pH 7 和 70 度下加热 30 分钟，而使牛乳凝结的活力仅下降 20% 。
- 木瓜蛋白酶对酯和酰胺类底物表现出很高的活力。

## 5.1.4 酸性蛋白酶：（重点介绍凝乳蛋白酶）

- 酸性蛋白酶是指蛋白酶具有较低的最适 pH，而不是指酸性基团存在于酶的活性部位。酶的活性部位含有一个或更多的羧基。
- 有胃蛋白酶、凝乳酶
- 凝乳酶是存在于哺乳期小牛第四胃中的蛋白酶，以无活性的酶原形式被分泌出来。随着小牛的长大，由摄取母乳改变成青草和谷物时，凝乳酶的数量下降，而胃蛋白酶的数量增加。

- 凝乳酶从无活性酶原转变成活性酶时经受了部分水解，分子量从 36000 下降到 31000，pH5 时酶原主要通过自身催化作用激活，而在 pH2 时，激活过程进行得非常快。
- 凝乳酶在 pH5.3~6.3 最稳定，在 pH3.5~4.5 由于自我消化而失活。在中性和碱性范围

于凝乳活力

- 凝乳酶催化酪蛋白沉淀是干酪制造中非常重要的一步。
- 原料乳杀菌——添加发酵剂、凝乳酶、色素——凝块形成——排除乳清——切块、搅拌、加热（  $\text{CaCl}_2 0.01\%$  ）——成型压榨——腌渍——发酵成熟——上色挂蜡——成品

## 5.1.5 蛋白酶水解蛋白质的苦味来源:

- 水解蛋白酶的苦味和蛋白质原有的氨基酸组成有关。特别是蛋白质中的疏水性氨基酸是导致蛋白质经水解后产生苦肽的重要原因。当蛋白质处于天然状态时，这些氨基酸**埋藏**在蛋白质结构的内部，因而对蛋白质的味道不会产生明显的影响。在**酶水解过程**中，小肽的数量将增加，从而暴露了这些疏水性氨基酸，当它们同味蕾相作用时就产生了苦味。

- 如果采取有控制的酶水解，使蛋白质的水解反应停止在某一个阶段，使肽键具有足够的长度将疏水性氨基酸埋藏在它的结构内部，就能减少水解蛋白质的苦味。

## 5.1.6 蛋白酶作为食品添加剂的应用：

- 1、作为肉类嫩化剂

多使用木瓜蛋白酶。从宰杀老龄的动物得到的肉类，经烧煮后口感粗糟和坚硬。肉类中存在一定数量的胶原蛋白，胶原蛋白中的交联数目和强度随动物年龄的增加而提高。木瓜蛋白酶从肉类感官评定和剪切力测定中



适合于配制肉类嫩化剂的蛋白酶必须具有**较高的耐热性**。这是因为嫩化剂的作用主要发生在当肉类被烧煮，温度逐渐升高，而酶尚未失活之前的这个阶段。烧煮导致肉类结缔组织中胶原蛋白和强性蛋白质变性，而蛋白酶较易作用于变性的胶原蛋白和弹性蛋白质。木瓜蛋白酶在 60~65 度时使胶原蛋白增溶的速度最快。

- 2、绿茶饮料浑浊：

浑浊物质主要是由蛋白质（ 15~65% ）和多酚类化合物（ 10~35% ），通称茶乳酪（ **creamy** ），是绿茶饮料生产中的关键，添加木瓜蛋白酶除去绿茶浸提液中的蛋白质，对稳定绿茶饮料十分有利。

## 5.2 溶菌酶

- 溶菌酶（N-乙酰胞壁质聚糖水解酶，EC3.2.1.17）又称为胞壁质酶，是一种专门作用于微生物细胞壁的水解酶。溶菌酶是由129个氨基酸构成的单纯碱性球蛋白，化学性质非常稳定。
- 在自然界中，溶菌酶普遍存在于鸟类、家禽的蛋清和哺乳动物的眼泪、唾液、血液、鼻涕、尿液、乳汁和组织细胞中（如肝、肾、淋巴组织、肠道等），从木瓜、芜菁、大麦、无花果和卷心菜、萝卜等植物中也能分离出溶菌酶，其中以蛋清含量最高。

- 在生物体内溶菌酶具有抗菌消炎，抗病毒，增强机体免疫力的生理功能，还可激活血小板，改善组织局部血液循环障碍，分泌脓液，增强局部防卫功能，具有止血、消肿等作用。它还可以作为一种宿主抵抗因子，对组织局部起保护作用。

## 5.2.1 溶菌酶的种类

- 溶菌酶的研究最早是从尼科尔 (Nicoile)1907 年发表枯草杆菌溶解因子的报告开始的。两年后， Laschtschenko 指出：鸡卵白强烈抑菌作用是酶作用的结果。 1922 年英国细菌学家弗莱明 (Fleming) 发现人的唾液、眼泪中存在这种能溶解细菌细胞壁的酶，因其具有溶菌作用，故命名为溶菌酶。

- 1937 年由 Abraham 与 Robinson 从卵蛋白中最先分离出晶体溶菌酶，此后人们在人和动物的多种组织、分泌液及某些植物、微生物中也发现了溶菌酶的存在，根据来源不同，将溶菌酶分为以下三类。

## • 5.2.1.1 动物源溶菌酶

- 动物源溶菌酶包括鸡蛋清溶菌酶及人和哺乳动物溶菌酶。鸡蛋清溶菌酶是目前研究和应用最多的，在鸡蛋清中约含有 3.5% 左右的酶，分子量为 14000，其等电点在 pH10.8 左右，最适效应温度在 50℃，化学性质稳定，pH 在 1.2 ~ 11.3 之间改变时对酶结构影响很小，pH 在 4 ~ 7 范围内 100℃ 处理 1min 仍有近 100% 的活力，在 210℃ 条件下加热 1.5h

—鸡蛋清溶菌酶在碱性环境条件下稳定性较差，分解 **G+** 细菌，但对 **G-** 细菌不起作用。研究表明其它鸟类蛋清溶菌酶也是由 **129** 个氨基酸残基组成，但其排列顺序和鸡蛋清溶菌酶不同，并且活性部位也不相同。

—人溶菌酶分子量为 14600 单位，对人的溶菌酶研究发现它是由 130 个氨基酸残基组成，也有 4 个 S-S 键，其一级结构氨基酸顺序及组成与鸡蛋清溶菌酶相比有极大的差异，但三级结构有相似性，其溶菌活性比鸡蛋清溶菌酶高 2 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溶菌酶，其化学性质与人溶菌酶相似，但结构尚不清楚，其溶菌活性远低于人溶菌酶。

## • 5.2.1.2 植物源溶菌酶

— 目前发现含溶菌酶的植物有近 170 种，在木瓜、无花果、大麦等植物中均已分离出溶菌酶。植物源溶菌酶分子量较大，约为 24000 ~ 29000 单位，其对溶壁小球菌的溶菌活性不超过鸡蛋清溶菌酶的 1/3，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。

### • 5.2.1.3 微生物源溶菌酶

- 上世纪 60 年代从微生物中分离出溶菌酶，根据其作用对象分为细菌细胞壁溶菌酶和真菌细胞壁溶菌酶。
- 细菌细胞壁溶菌酶可分为三大类：N-乙酰氨基己糖苷酶，它破坏细菌细胞壁肽聚糖中  $\beta$ -(1, 4) 糖苷键；酰胺酶，它催化裂解细菌细胞壁肽聚糖中 N-乙酰胞壁酸与肽“尾”之间的 N-乙酰胞壁酸-L-丙氨酸键；内肽酶，它催化裂解肽聚糖肽桥中的肽键。

—现在研究发现，细菌细胞壁溶菌酶的抗菌活性不仅表现在其分解细菌细胞壁方面，当酶受到不可逆抑制后，它仍然显示出抗菌效应；不同来源的细菌细胞壁溶菌酶有不同的抗菌范围，并对不同类型的肽聚糖有特异性。

— 真菌细胞壁溶菌酶包括几丁质酶和  $\beta$ - 葡聚糖酶

。

抗真菌的几丁质酶主要是内几丁质酶，首先是在植物中发现，这类几丁质酶可以对抗侵入植物体的真菌病原体，后来人们在链霉菌属、杆菌和大多数真菌也发现该酶，真菌几丁质酶与植物几丁质酶相似。几丁质酶主要用于真菌细胞壁的降解和重组，但在大多数产几丁质酶的真菌中，此酶主要用于真菌细胞壁的成型过程，由于肽聚糖和甲壳质的糖骨架具有相似的结构，一些几丁质酶也具有溶菌酶活性。

–  $\beta$ - 葡聚糖酶 ( $\beta$ -glucanases) 是另一类真菌细胞壁溶菌酶，包括  $\beta$ -(1 , 3) 葡聚糖酶，  $\beta$ -(1 , 6) 葡聚糖酶和甘露聚糖酶等，主要用于分解酵母细胞的细胞壁。如  $\beta$ -(1 , 3) 葡聚糖酶主要作用是它能水解  $\beta$ -(1 , 3) 糖苷键，还可以对几丁质降解真菌细胞壁起到显著的协同作用，将纯化的几丁质酶和  $\beta$ - 葡聚糖酶合用，其抗灰色葡萄孢 (*Botrytis cinera*) 的作用能够提高 10 倍。

## 5.2.2 溶菌酶的性质及作用机理

- 溶菌酶纯品为白色或微黄、黄色的晶体或无定型粉末，无异味，微甜，易溶于水，遇碱易被破坏，不溶于乙醚。其活性受以下因素影响。

## • 5.2.2.1 温度对溶菌酶活性的影响

- Weaver 等发现在  $60^{\circ}\text{C}$  以上牛乳中的溶菌酶活性下降。Hayase 等发现溶菌酶通过二硫键聚合， $180^{\circ}\text{C}$  时聚合和降解同时进行，当  $>200^{\circ}\text{C}$  时肽键的断裂和重组发生，聚合和降解变得更为剧烈。
- Frasco 等用红外光谱研究了溶菌酶的热变性机理，发现它是和水结构密切相关的。其它外侧非极性氨基酸残基对变性无重要影响，从外侧极性氨基酸游离出的水在其始变性过程中起重要作用，水进入内部肽 - 肽键中，使蛋白质膨胀和伸展。

## • 5.2.2.2 pH 对溶菌酶活性的影响

- 溶菌酶在酸性 pH 下是稳定的，此时 100℃ 的加热对溶菌酶仅有很小的活性损失。Matsuoka 等报道 pH4.5(100℃ 、 3min)、 pH5.29(100℃ , 30min) 的加热对溶菌酶是稳定的。 Beychok 等报道溶菌酶在 pH5.5 最为稳定。

### • 5.2.2.3 化学物质对溶菌酶的影响

- Back 等研究表明糖和聚烯烃类能增加溶菌酶的热稳定性， Hidaka 等发现 NaCl 对溶菌酶也有抗热变性作用。同时 Kravchenko 等发现盐溶液的存在对溶菌酶的活性是十分必要的， Chang 的研究也发现溶菌酶的活性在低盐浓度时和离子强度密切相关的，在高盐浓度时溶菌酶的活性受到抑制，阳离子的价态越高则其抑制作用越强。 Yashitake 等发现具有  $\text{-COOH}$  和  $\text{-SH}$  基的多糖对溶菌酶活性有抑制作用。

## • 5.2.2.4 加工过程对溶菌酶活性的影响

— 在一个冷冻干燥的模拟体系中溶菌酶有聚合、生物活性损失和其它化学变化。

溶菌酶和过氧亚油酸的反应生成了二聚和高聚体；多聚是因为随水活性增加共价键交联度、蛋白质不溶性和酶活性损失增加引起的。

## • 5.2.2.5 络合作用对溶菌酶活性的影响

—溶菌酶可和许多物质形成络合物导致其活性丧失。等量蛋清和蛋黄的混合物其溶菌酶无活性，脱水整蛋仅保留部分溶菌酶活性，蛋黄在 pH6.2 磷酸盐缓冲液中使纯溶菌酶失活。研究者认为抑制机理是在溶菌酶和蛋黄化合物间形成静电相互作用的络合物所致。

-N- 乙酰葡萄糖胺的  $\beta(1-4)$  键多聚物是溶菌酶的底物。它们间形成一聚、二聚、三聚、四聚体，是溶菌酶的抑制剂。SDS 结合到活性位上强烈抑制了溶菌酶活性，除此之外其它和溶菌酶形成络合物的物质有：胸腺泡核、酵母泡核、甲状腺素、甲状腺球蛋白、 $\alpha$ -La、咪唑核吡啶生物。阳离子如  $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  等均可抑制溶菌酶的活性 ( $10^{-3} \sim 10^{-2}\text{mol/L}$ )

## 5.2.3 溶菌酶的抗菌机理

- 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 (N-acetylglucosamine) 及 N-乙酰胞壁酸 (N-acetylmuramic acid) 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 (Peptidoycan)。

- 肽聚糖是细菌细胞壁的主要成分，它是由 **NAM**、**NAG** 和肽“尾”（一般是 4 个氨基酸）组成，**NAM** 与 **NAG** 通过  $\beta$ -1, 4 糖苷键相连，肽“尾”则是通过 **D**- 乳酰羧基连在 **NAM** 的第 3 位碳原子上，肽尾之间通过肽“桥”（肽键或少数几个氨基酸）连接，**NAM**、**NAG**、肽“尾”与肽“桥”共同组成了肽聚糖的多层网状结构，作为细胞壁的骨架，上述结构中的任何化学键断裂，皆能导致细菌细胞壁的损伤。

- 溶菌酶能有效地水解细菌细胞壁的肽聚糖，其水解位点是 N- 乙酰胞壁酸 (NAM) 的 1 位碳原子和 N- 乙酰葡萄糖胺 (NAG) 的 4 位碳原子间的  $\beta$ -1, 4 糖苷键，结果使细菌细胞壁变得松弛，失去对细胞的保护作用，最后细胞溶解死亡。
- 对于 G+ 细菌与 G- 细菌，其细胞壁中肽聚糖含量不同， G+ 细菌细胞壁几乎全部由肽聚糖组成，而 G- 细菌只有内壁层为肽聚糖，因此，溶菌酶只能破坏 G+ 细菌的细胞壁，而对 G- 细菌作用不大

## **5.2.4 溶菌酶在食品上的应用**

- **5.2.4.1 溶菌酶用于水产类熟制品、肉类制品的防腐和保鲜**

—溶菌酶可作为鱼丸等水产类熟制品和香肠、红肠等肉类熟制品的防腐剂。只要将一定浓度 (通常为 0.05%) 的溶菌酶溶液喷洒在水产品或肉类上, 就可起到防腐保鲜的

## • 5.2.4.2 用于新鲜海产品和水产品的保鲜

- 一些新鲜海产品和水产品 ( 如: 虾、蛤蜊肉等 ) 在 0.05% 的溶酶菌和 3% 的食盐溶液中浸渍 5min 后, 沥去水分, 进行常温或冷藏储存, 均可延长其储存期。

### • 5.2.4.3 在乳制品中的应用

- 溶菌酶在人乳中含量最高，是牛乳的 3000 倍，是山羊乳的 1600 倍，溶菌酶是婴儿生长发育必需的抗菌蛋白，在人工喂养或食用母乳不足的婴儿食品中添加溶菌酶是非常必要的。因为溶菌酶是人体的一种非特异性免疫因子，对杀死肠道腐败球菌有特殊作用。溶菌酶在婴儿体内可以直接或间接促进婴儿肠道细菌双歧杆菌增殖，它可以促进婴儿胃肠内乳酪蛋白形成微细凝乳，有利于婴儿消化吸收；

—溶菌酶也可以促进人工喂养婴儿肠道细菌群的正常化；它能够加强对血清灭菌蛋白， $\gamma$ -球蛋白等体内防御因子，以增加对感染的抵抗力，特别是对早产婴儿有预防体重减轻，预防消化器官疾病，增加体重的功效。所以溶菌酶是婴儿食品、婴儿配方奶粉等的良好添加剂。

- 在奶酪生产中使用溶菌酶，特别是中期、长期熟化奶酪中，可以防止奶酪的后期起泡，以及奶酪风味变化，而且不影响在老化过程中的奶酪基液。溶菌酶不仅对乳酸菌生长很有利，而且还能抑制污染菌引起的酪酸发酵，这种特性为一般防腐剂不能达到的。
- 溶菌酶还可用于乳制品防腐，尤其适用于巴氏杀菌奶，能有效地延长其保存期，由于溶菌酶具有一定的耐高温性能，也适用于超高温瞬时杀菌奶。

## • 5.2.4.4 在糕点和饮料上的应用

- 在糕点中加入溶菌酶，可防止微生物的繁殖，特别是含奶油的糕点容易腐败，在其中加入溶菌酶也可起到一定的防腐作用。
- 在 pH6.0 ~ 7.5 的饮料和果汁中加入一定量的溶菌酶具有较好的防腐作用。在低度酒方面的应用是日本已成功地使用鸡蛋蛋清溶菌酶代替水杨酸作为防腐剂用于清酒的防腐，其加入量为 15mg/kg 。此外溶菌酶还可作为料酒和葡萄酒的防腐剂和澄清剂，使用量为 0.005% ~ 0.05% 。

## • 5.2.4.5 用于制备细胞浸提物

- 酵母膏是发酵工业中用量最多的一类培养基成分，它的制备目前大多是采用酵母自溶法或酵解酵母的方法制成的。如果改用溶菌酶制备酵母膏，则不仅可以提高浸膏量的收率，还可以大大缩短酵母膏的制备时间。也可以用溶菌酶从酵母细胞中制备呈味物质，如有些溶菌酶中除了含有溶菌酶的活性外，还可以含有能分解酵母细胞中的核酸为肌苷酸和鸟苷酸的单核苷类的呈味物质。

## • 5.2.4.6 溶菌酶在食品包装工业中的应用

- 将溶菌酶固定化在食品包装材料上，生产出有抗菌功效的食品包装材料，以达到抗菌保鲜功能。目前许多肉制品软包装都需要经过高温灭菌处理。经过处理的肉制品脆性变差甚至产生蒸煮味。如果在产品真空包装前添加一定量的溶菌酶 (1% ~ 3%)，然后巴氏杀菌 (80 ~ 100℃，25 ~ 30min)，可获很好的保鲜效果。

## • 5.2.4.7 在功能性食品中的应用

—溶菌酶是一种无毒、无害的高盐基蛋白质，且具有一定的保健作用，有抗感染和增强抗生素作用效力，促进血液凝固及止血作用，有组织再生作用。因此，可以在保健食品中添加一定量以提高保健效果。

谢 谢！