

# 干酪乳杆菌 6033 蛋白酶降解肌肉蛋白质的作用研究

王 俊, 周光宏, 徐幸莲, 黄 明

(南京农业大学 农业部农畜产品加工与质量控制重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

**摘 要:** 本试验将干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*, Lc)6033 蛋白酶液按 5% 的比例分别加入肌浆蛋白和肌原纤维蛋白提取液, 然后设定不同的 pH 值, 于 15℃ 培养 7d, 定时取样, 测定反应后的 pH 值、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测蛋白质的变化。结果发现: 不同设定的肌浆蛋白和肌原纤维蛋白试验组在反应初期 pH 值均稍稍降低, 随着反应进程, 各试验组的 pH 值呈现出逐步升高的趋势; 其中, 肌浆蛋白以 pH5.0、4.5 组的变化较为明显, 肌原纤维蛋白则以 pH6.0、5.0、4.5 组的变化较为明显。经 7d 振荡培养后, 电泳检测发现, 各试验组肌浆蛋白均表现出分解现象, 尤其以 pH5.0 组和 pH4.5 组更为明显; 而肌原纤维蛋白也都表现出了明显的分解现象, 尤以 pH 5.0 组肌原纤维蛋白分解最明显。

**关键词:** 干酪乳杆菌; 蛋白酶; 肌肉蛋白质; 降解

收稿日期: 2003-12-23

基金项目: “十五”国家高技术研究发展计划(863)项目(2002AA248031)

作者简介: 王俊(1971-), 男, 博士, 研究方向为畜产品加工与质量控制。

3.1 随着 IHP 处理压力增大, 微生物的存活率愈小, 但下降至一定程度后, 变化趋缓。

3.2 随着 IHP 处理次数增多, 微生物的存活率愈小, 对于某一类微生物的杀灭或许存在多大压力条件下进行多少次可以获得最为经济同时又最彻底的工艺条件。

3.3 不同的食品(介质)成分对 IHP 杀菌效果影响或许是不同的, 而对于奶类、纤维物料类等介质比蒸馏水更有利于保护微生物作用。

## 参考文献:

- [1] Lutz Popper, Dietrich Knorr. Application of high-pressure homogenization for food preservation[J]. Food Technology, 1990, (7): 84-90.
- [2] Heinz V, et al. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by ultra-high-pressure in combination with other treatment[A]. IFT Annual Meeting, 1995, 268.
- [3] Neil H. Mermelstein, High-Pressure pasteurization Juice[J]. Food Technology, 1999, (4): 86-90.
- [4] S C Feijoo, et al. Effects of microfluidizer technology on *Bacillus licheniformis* spores in ice cream mix[J]. Jour of Dairy Science, 1997, (9): 2184-2187.
- [5] M E Guerzoni, et al. Effect of high pressure homogenization on microbial and chemico-physical characteristics of goat cheese[J]. J Dairy Sci, 1999, (5): 851-862.
- [6] The Coca-Cola Co. Ultra high pressure homogenization of unpasteurized juice. USA Patent, 1993, (5): 232, 726.
- [7] 杜军, 张绍英, 等. 动力作用作为冷杀菌方法的可行性初探[J]. 中国乳品工业, 2002, (6): 25-27.
- [8] 郑家林. 微射流均质机——一种高效新型乳化设备[J]. 广州食品工业科技, 1994, (1): 59.
- [9] Sien Y Soon, John Harbidge, et al. Prediction of drop breakage in an ultra high velocity jet homogenizer[J]. Journal of Chemical Engineering of Japan, 2001, (5): 640-646.
- [10] 刘成梅, 刘伟, 等. Microfluidizer对膳食纤维溶液物理性质的影响[J]. 食品科学, 2004, (2): 72-75.
- [11] 刘成梅, 刘伟, 等. Microfluidizer对膳食纤维的微粒粒度分布的影响[J]. 食品科学, 2004, (1): 52-55.
- [12] 刘成梅, 刘伟, 等. 微射流均质机流体动力学行为分析[J]. 食品科学, 2004, (4): 58-62.
- [13] 刘伟, 刘成梅, 等. 高压过程中的压力与能量分析[J]. 食品科学, 2003, (7): 162-164.
- [14] 刘伟. 瞬时高压作用对膳食纤维的物理性质影响及其杀菌机制[D]. 南昌大学硕士毕业论文, 2004.
- [15] 李汴生, 等. 超高压杀菌及其反应动力学[J]. 食品科学, 1997, (9): 3-8.

Degradation of Muscle Proteins by Proteinases from *Lactobacillus casei* 6033

WANG Jun, ZHOU Guang-hong, XU Xing-lian, HUANG Ming

(Key Laboratory of Farm and Animal Products Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The changes of pH and sarcoplasmic and myofibrillar proteins in extract added with 5% Lc 6033 proteinase subsequent to incubation in different pH at 15°C for 7d were studied. The results showed that the pH values decreased slightly both in sarcoplasmic and myofibrillar proteins solution, and then increased gradually with the reaction processing. The significant changes occurred at pH5.0, 4.5 for sarcoplasmic protein and pH6.0, 5.0, 4.5 for myofibrillar proteins, respectively. Electrophoresis (SDS-PAGE) indicated that both sarcoplasmic and myofibrillar proteins were degraded by Lc 6033 after 7d incubation at 15°C. And marked changes were found at pH5.0, 4.5 for sarcoplasmic proteins and pH 5.0 for myofibrillar proteins, respectively. Those results above demonstrated that the proteinases from Lc could degrade muscle proteins. Under low pH values, degradation of both sarcoplasmic proteins and myofibrillar proteins were more distinct than under high pH values, and the effect of proteinases from Lc on sarcoplasmic proteins was little stronger than myofibrillar proteins under lower pH value, in vitro.

**Key words:** *Lactobacillus casei*; proteinase; muscle protein; degradation

中图分类号: TS251.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)02-0090-07

近年来研究人员对肉制品乳酸发酵的理化特性变化研究表明,蛋白酶、脂酶的存在是风味产生的前提,由糖、蛋白质、脂肪的分解产物相互作用而形成了发酵香肠特有的风味<sup>[1,2]</sup>。国外研究表明:发酵香肠成熟期间,在脂肪降解的同时,蛋白质也发生不同程度的降解产生多肽、氨基酸等呈味物质,部分氨基酸随后脱羧、脱氨或进一步代谢成醛、酮等小分子化合物,对发酵香肠的鲜味和香味的形成起了重要作用<sup>[3,4]</sup>。目前,对发酵香肠中肌肉蛋白质降解及风味物质的研究较多,而对发酵香肠中乳酸菌发酵剂对肌肉蛋白质降解能力的研究才刚刚开始,报道也较少。

本试验将干酪乳杆菌蛋白酶液分别添加到牛肉肌浆蛋白和肌原纤维蛋白提取液中,并设定不同的pH值,经过7d振荡培养后,分别研究反应物pH值和不同pH值条件下肌肉蛋白质的变化,观察干酪乳杆菌6033蛋白酶在离体条件下降解肌肉蛋白质的能力,从而确认干酪乳杆菌6033在发酵香肠肌肉蛋白质降解中是否起作用,也为筛选分解蛋白质能力强的发酵香肠发酵剂乳酸菌提供方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

#### 1.1.1 主要试验材料

干酪乳杆菌 购自中国食品发酵工业研究所,编号6033;原料肉 牛背最长肌,市售。聚丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺:Fluka产,瑞士;高分子量标准蛋白

质、中分子量标准蛋白质、过硫酸铵:均为Promega产,美国;三羟甲基氨基甲烷(Tris)、牛血清白蛋白(BSA)、 $\beta$ -巯基乙醇、十二烷基硫酸钠(SDS)、乙二醇双(2-氨基乙基)四乙酸(EGTA)、四甲基乙二胺(TEMED)、叠氮钠:均为Sigma产,美国;其它试剂均为国产分析纯。

#### 1.1.2 主要仪器与设备

穿刺式pH计 HANNA HI 9025,葡萄牙;高速冷冻离心机 Beckman Allegra 64R,美国;紫外分光光度计 UV-754,上海;超声波细胞破碎仪 VCX-600,美国;快速恒温数显水箱 国华HH-42,常州;DY602S稳流稳压电泳仪、CC-B垂直电泳槽、TY-80S脱色摇床 均为南京大学产;生物电泳图像分析系统 FR-980,上海;高速分散器 金达XHF-1,上海;一次性滤器 Pall,  $\Phi$  0.22  $\mu$ m;振荡培养箱 DNZ-C,江苏太仓。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 增菌培养

将经过两次活化的干酪乳杆菌6033菌悬液按2%的接种量接入40L MRS液体培养基,经30°C、最佳增菌时间20h培养<sup>[5]</sup>。培养物经4°C、10000  $\times$  g离心15min,沉淀物用0.05mol/L PBS(pH7.0)洗涤3次后混悬于两倍体积的20mmol/L Tris-HCl(pH7.5)中。

### 1.2.2 粗酶液制备

将上述菌悬液进行超声波破碎<sup>[6]</sup>,菌细胞裂解液经4°C、15000  $\times$  g离心30min,上清液即为粗酶液。

### 1.2.3 肌肉蛋白质的提取

#### 1.2.3.1 肌浆蛋白质的提取

肌浆蛋白质的提取参考文献[7]的方法(图1)。

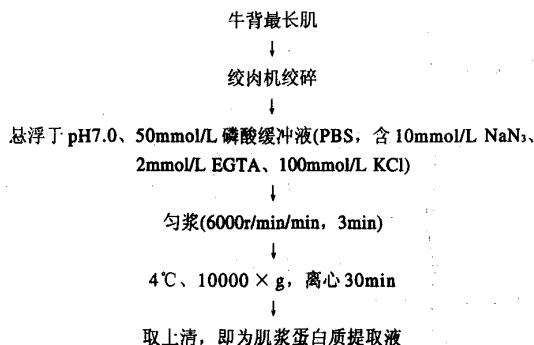


图1 牛肉肌浆蛋白质提取流程图

Fig.1 Procedures used for purification of beef myogen

### 1.2.3.2 肌原纤维蛋白质的制备

肌原纤维蛋白质的提取和纯化参考 Huff-lonergan<sup>[8]</sup>的方法, 提取流程见图2。

### 1.2.3 蛋白质浓度测定

采用 Bradford 检测法<sup>[6]</sup>测定蛋白质浓度。

### 1.2.4 试验设定

参照文献[5]的方法并修改后进行试验设定。

#### 1.2.4.1 肌浆蛋白质组试验设定

取肌浆蛋白提取液 100ml, 均分成 5 组, 每组各 20ml, 一组作空白对照, 其余每组分别添加 5% 干酪乳杆菌蛋白酶液, 分别调 pH 值为 7.0、6.0、5.0、4.5, 于 15°C 振荡培养(150r/min)7d, 定时测定 pH 值、取样。

#### 1.2.4.2 肌原纤维蛋白质组试验设定

肌原纤维蛋白用 pH7.0、50mmol/L PBS 洗涤三次, 然后悬浮于 pH7.0、50mmol/L PBS(含 15mmol/L NaN<sub>3</sub>、100mmol/L KCl)中。取提取液 100ml, 均分成 5 组, 每组各 20ml, 试验处理同上。

### 1.2.5 试验测定

#### 1.2.5.1 pH 值测定

分别于 0、24、48、72、96h、7d 测定每个组的 pH 值(n=3, 取平均值)。

#### 1.2.5.2 SDS-PAGE 测定样品中蛋白质的变化

分别于 0、24、48、72、96h、7d 取样, 按文献[7]的方法进行电泳分析(SDS-PAGE)。浓缩胶: 浓度为 5%, 电压 60V; 分离胶: 浓度—肌浆蛋白质组为 15%、肌原纤维蛋白质组为 10%, 电压 100V。

### 1.2.6 统计分析

采用 SAS 软件 6.12 版分析, 多重比较采用 Fisher' LSD 法。

## 2 结果与分析

### 2.1 干酪乳杆菌蛋白酶降解肌肉蛋白质过程中 pH 值的



图2 牛肌原纤维提取流程图

Fig.2 Procedures used for purification of beef myofibril

### 变化

#### 2.1.1 肌浆蛋白质提取液 pH 值的变化

空白对照组在 7d 培养中 pH 值没有明显变化。由图 3 可见, pH7.0 组在反应 1d 后 pH 值降到最低(6.36), 反应 3d 后升至 6.44, 7d 时 pH 值为 6.45, 与 1d 相比差异都不显著( $p > 0.05$ ); pH6.0、5.0、4.5 组在 1d 后 pH 值分别降到 5.30、4.60、4.18, 3d 后分别升高至 5.44、4.82、4.54, 7d 时 pH 值为 5.47、4.85、4.59, 与 1d 比差异均显著或极显著( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$ )。

各试验组在反应 24h 左右时 pH 值降到最低, 然后又呈现出逐步升高的趋势, 可能是由于随着反应的进行, 肌浆蛋白质发生降解产生了碱性的肽、游离氨基

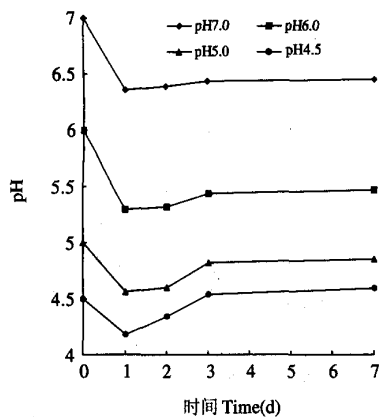


图3 肌浆蛋白提取液pH值的变化 (n=3)

Fig.3 Changes of pH value from beef myogen

酸等而使反应环境pH值升高；又以pH5.0、4.5组的变化较为明显，可能是因为低pH值条件下蛋白酶活性增加，有利于蛋白质的降解。但各试验组在反应的前24h pH值为什么会降低，其原因有待于进一步研究。

2.1.2 肌原纤维蛋白质提取液pH值的变化

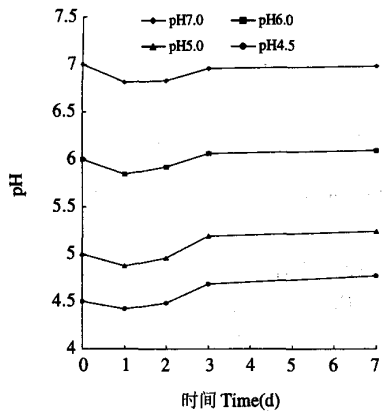


图4 肌原纤维蛋白提取液pH值变化 (n=3)

Fig. 4 Changes of pH value from beef myofibrillar protein

空白对照组在7d培养过程中pH值也没有明显变化。由图4可见，pH7.0、6.0、5.0、4.5组在反应1d后pH值均降到最低，然后逐渐升高，3d后分别升至6.96、6.06、5.19、4.68，7d时pH值为6.98、6.09、5.24、4.77，与1d比差异均显著或极显著( $p < 0.05$ 或 $p < 0.01$ )。

各试验组在反应1d左右时pH值降到最低，然后也呈现出逐渐升高的趋势，同样可能是因为随着反应进行，肌原纤维蛋白质降解产生了碱性的肽、游离氨基酸等而使反应环境pH值升高。其中以pH6.0、5.0、4.5组的变化更为明显，原因可能也是较低的pH值适合蛋白酶发挥水解作用。与肌浆蛋白组相类似，各试验

组反应1d后pH值降低的原因也有待于进一步研究。

2.2 SDS-PAGE测定样品中蛋白质的变化

2.2.1 肌浆蛋白质组

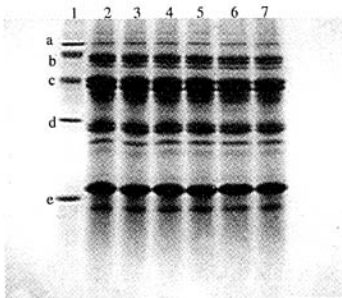
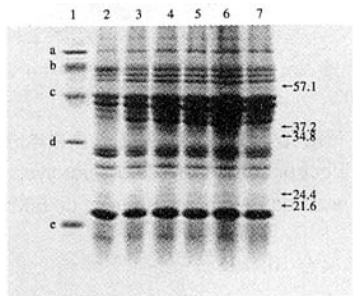


图5 肌浆蛋白质电泳图谱(对照)

Fig. 5 Electrophoresis profile of beef sarcoplasmic

由图5可见，空白对照组在不同pH值条件下，经7d振荡培养后，肌浆蛋白质提取液电泳条带没有明显变化，表明肌浆蛋白提取液中缺少肌浆蛋白的分解酶。



1. 标准蛋白质 (kD): a-97.4, b-66.2, c-42.7, d-31.0, e-14.4; 2. 0d; 3. 24h; 4. 48h; 5. 72h; 6. 96h; 7. 7d.

图6 干酪乳杆菌蛋白酶降解肌浆蛋白电泳图谱(pH7.0)

Fig. 6 Electrophoresis profile of hydrolysis of sarcoplasmic proteins by proteinase from Lc 6033(pH7.0)

pH7.0组经7d振荡培养后，肌浆蛋白表现出一定的分解现象，但并不明显，和0h相比，陆续新增了57.1、37.2、34.8、24.4、21.6kD等条带(图6)。pH6.0组经7d培养后，肌浆蛋白也表现出一定的分解现象，和0h相比，陆续新增了57.1、53.8、37.2、34.8、26.5、24.4、21.6、10.4kD等条带；与pH7.0组相比，新增53.8、26.5、10.7kD等条带(图7)。

从图8可以看出，pH5.0组经7d培养后，肌浆蛋白表现出了明显的分解现象，和0h相比，原有的条带大多数减弱或消失了；与pH7.0组、pH6.0组相比，除了肌浆蛋白原有条带绝大多数减弱或消失，前两者新增

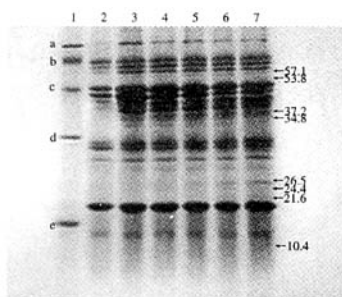


图7 干酪乳杆菌蛋白酶降解肌浆蛋白电泳图谱(pH6.0)  
Fig.7 Electrophoresis profile of hydrolysis of sarcoplasmic proteins by proteinase from Lc 6033 (pH6.0)

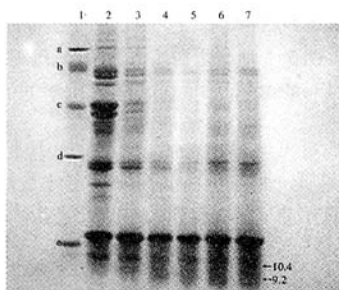


图8 干酪乳杆菌蛋白酶降解肌浆蛋白电泳图谱(pH5.0)  
Fig.8 Electrophoresis profile of hydrolysis of sarcoplasmic proteins by proteinase from Lc 6033 (pH5.0)

的条带也仅有 10.4kD 条带等较为清晰,并新增了 9.2kD 等条带。

而 pH4.5 组经 7d 培养后,肌浆蛋白则表现出了更为明显的分解现象,和 0h 相比,原有条带几乎全部减弱或消失;与 pH7.0 组、pH6.0 组、pH5.0 组相比,除了肌浆蛋白原有条带几乎全部减弱或消失,前三组新增的条带仅保留了 10.4、9.2kD 等条带,并新增了 13.3kD 等条带(图 9)。

## 2.2.2 肌原纤维蛋白质组

由图 10 可见,空白对照组在不同 pH 值条件下,经 7d 振荡培养后,肌原纤维蛋白提取液电泳条带也没有明显的变化,表明肌原纤维蛋白提取液中不含分解肌原纤维蛋白的蛋白酶。

pH7.0 组 7d 培养后,肌原纤维蛋白的分解较明显,和 0h 相比,200、160、100、43.0、32.9、30.1、26.6、19.4、18.7、16.5、12.5、11.0kD 等条带不同程度减弱,并陆续新增 84.5、73.2、68.5、64.4、51.2、45.5、23.1kD 等条带(图 11)。

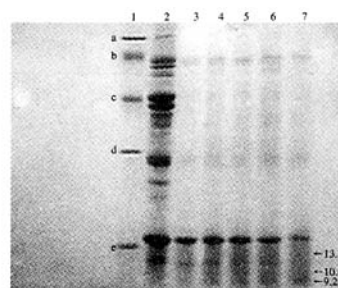


图9 干酪乳杆菌蛋白酶降解肌浆蛋白电泳图谱(pH4.5)  
Fig.9 Electrophoresis profile of hydrolysis of sarcoplasmic proteins by proteinase from Lc 6033(pH4.5)

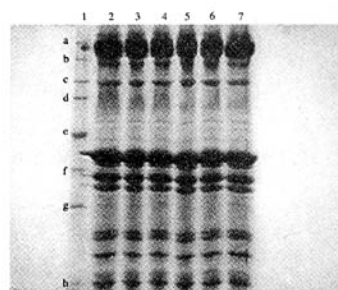


图10 肌原纤维蛋白质电泳图谱(对照)  
Fig.10 Electrophoresis profile of beef myofibrillar proteins

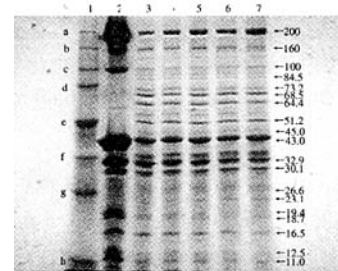
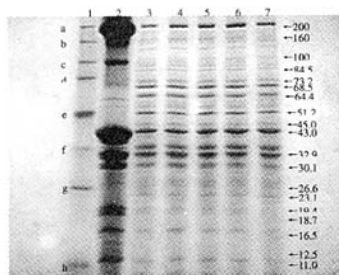


图11 干酪乳杆菌蛋白酶降解肌原纤维蛋白电泳图谱(pH7.0)  
Fig.11 Electrophoresis profile of hydrolysis of beef myofibrillar proteins by proteinase from Lc(pH7.0)

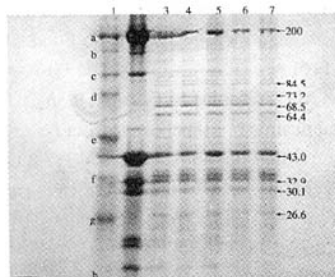
pH6.0 组经 7d 培养后,肌原纤维蛋白表现出了更为明显的分解现象,和 0h 相比,200、160、100、43.0、32.



1. 标准蛋白质(kD): a-225, b-150, c-100, d-75, e-50, f-35, g-25, h-10;  
2. 0d; 3. 24h; 4. 48h; 5. 72h; 6. 96h; 7. 7d。

图 12 干酪乳杆菌蛋白酶降解肌原纤维蛋白电泳图谱  
(pH6.0)

Fig.12 Electrophoresis profile of hydrolysis of beef myofibrillar proteins by proteinase from Lc 6033 (pH6.0)



1. 标准蛋白质(kD): a-225, b-150, c-100, d-75, e-50, f-35, g-25, h-10;  
2. 0d; 3. 24h; 4. 48h; 5. 72h; 6. 96h; 7. 7d。

图 13 干酪乳杆菌蛋白酶降解肌原纤维蛋白电泳图谱  
(pH5.0)

Fig.13 Electrophoresis profile of hydrolysis of beef myofibrillar proteins by proteinase from Lc 6033 (pH5.0)

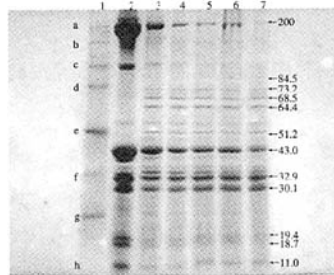
9、30.1、26.6、19.4、18.7、16.5、12.5、11.0kD 等条带明显减弱甚至消失,并新增了 84.5、73.2、68.5、64.4、51.2、45.5、23.1kD 等条带(图 12)。

从图 13 可以看出, pH5.0 组经 7d 培养后,肌原纤维蛋白表现出非常明显的分解现象,和 0h 相比,除 200、43.0、32.9、30.1、26.6kD 等条带明显减弱外,其余条带几乎全部消失;与 pH7.0 组、pH6.0 组相比,除肌原纤维蛋白原有条带绝大多数消失或明显减弱了,新增的也仅能看出 84.5、73.2、68.5、64.4kD 等条带。

pH4.5 组经 7d 培养后,肌原纤维蛋白也表现出了明显的分解现象,和 0h 相比,除 200、43.0、32.9、30.1、19.4、18.7、11.0kD 等条带明显减弱外,其余条带几乎消失;与 pH7.0 组、pH6.0 组相比,新增的也仅能看出 84.5、73.2、68.5、64.4、51.2kD 等条带(图 14)。

### 3 讨论

蛋白质分解成大量的小肽及游离氨基酸已被证明是



1. 标准蛋白质(kD): a-225, b-150, c-100, d-75, e-50, f-35, g-25, h-10;  
2. 0d; 3. 24h; 4. 48h; 5. 72h; 6. 96h; 7. 7d。

图 14 干酪乳杆菌蛋白酶降解肌原纤维蛋白电泳图谱  
(pH4.5)

Fig.14 Electrophoresis profile of hydrolysis of beef myofibrillar proteins by proteinase from Lc 6033 (pH4.5)

发酵香肠风味形成的重要因素<sup>[3,4]</sup>。影响发酵香肠中蛋白质分解的因素可能是多方面的,如微生物蛋白酶和肉中的内源蛋白酶(组织蛋白酶),但目前很难准确衡量每种因素对发酵香肠中蛋白质分解所作的贡献。

以前对乳酸菌分解蛋白质的研究主要局限于乳制品。部分学者认为:虽然乳酸菌是发酵香肠生产中的优势菌,但其主要作用是产酸,以获得发酵香肠特有的酸味及质地,而对蛋白质的分解很微弱,因此一般忽略乳酸菌在发酵香肠中小肽及游离氨基酸形成过程中所起的作用;相反,肌肉内源蛋白酶对肌肉蛋白具有较强的分解能力,其中组织蛋白酶 B、H、L、D 等分解作用强,而且组织蛋白酶已被证实是在发酵肉制品发酵和成熟条件下,能长期发挥作用<sup>[9]</sup>;另外,肌肉中氨肽酶及肽酶也被陆续分离、鉴定,故发酵香肠中肌肉蛋白质分解是由肌肉内源蛋白酶引起<sup>[10]</sup>的。

近年来,有较多的研究表明乳酸菌能水解肌肉蛋白质。Toldra 等发现清酒乳杆菌能分泌二肽酶<sup>[11]</sup>、三肽酶<sup>[12]</sup>及氨肽酶<sup>[13]</sup>,并对这些酶进行了分离、纯化和鉴定。因此有人认为发酵香肠中蛋白质的分解是肌肉内源酶和微生物共同作用的结果,首先主要由组织蛋白酶分解肌肉蛋白成多肽,然后再主要由细菌把多肽分解成氨基酸<sup>[14]</sup>。目前又有学者发现乳酸菌细胞壁连接的蛋白酶对肌原纤维蛋白及肌浆蛋白均有一定的分解作用<sup>[15,16]</sup>;加之由于其在整个发酵与成熟过程中一直保持较高的细菌浓度,因此,所起的作用不可忽视。

Toldra 等<sup>[13][15]</sup>进一步研究了几种乳酸菌对肌浆蛋白和肌原纤维蛋白分解能力,发现虽然乳酸菌分解蛋白的能力较弱,但在高浓度下均表现出一定的分解现象。徐为民等人的研究表明植物乳杆菌 6003 对肌肉蛋白有降解作用<sup>[7]</sup>。Fadda 等人对干酪乳杆菌、植物乳杆菌、弯曲乳杆菌(CECT904 和 NCDO2739)、清酒乳杆菌(NCDO2714、CECT4808 和 L110)等不同种的乳杆菌对肌

浆蛋白的降解能力进行了研究,结果也表明乳杆菌对肌浆蛋白有降解作用<sup>[14][17,18]</sup>。

从图5和图10可以看出,本试验中,肌肉内源蛋白酶在肌浆蛋白和肌原纤维蛋白的提取过程中已经失活或被抑制,因此可以排除内源蛋白酶对肌浆蛋白和肌原纤维蛋白降解作用的影响,同时也可确定肌肉蛋白的降解是由干酪乳杆菌粗酶液作用引起的。

很多研究表明,干酪乳杆菌、植物乳杆菌、弯曲乳杆菌等的活细胞和细胞裂解液对肌肉蛋白的降解能力相差很大。Sanz等<sup>[19]</sup>报道,干酪乳杆菌 CRL705 活细胞在肌浆蛋白中培养 96h 后,200、99~50、45~31kDa 的蛋白质发生了降解,电泳条带明显减弱;加细胞裂解液后肌浆蛋白也发生降解,但很微弱;而将活细胞和细胞裂解液同时加入肌浆蛋白时,肌浆蛋白质绝大部分被降解。细胞裂解液对肌原纤维蛋白(主要是肌球蛋白和肌动蛋白)有明显的降解作用;而干酪乳杆菌 CRL705 活细胞对肌原纤维蛋白的降解作用较弱,同时添加活细胞和细胞裂解液时,肌原纤维蛋白的降解作用更加明显。徐为民等<sup>[7]</sup>、Toldra 等<sup>[18]</sup>、Kunj 等<sup>[20]</sup>的结论与此相似,这些都表明肌浆蛋白是干酪乳杆菌活细胞蛋白酶的作用底物,而肌原纤维蛋白是细胞裂解液中蛋白酶的作用底物。在本试验中,对干酪乳杆菌活细胞进行了超声波破碎处理,并保留了细胞碎片(主要是细胞膜)得到的粗酶液中既有胞内酶又有胞外酶,因而对肌浆蛋白和肌原纤维蛋白都表现出明显的降解作用。本试验中所用的干酪乳杆菌酶粗提液相当于活细胞和细胞裂解液的复合物。

从本试验可以看出,反应环境的 pH 值对肌肉蛋白的酶降解有一定的影响。对于肌浆蛋白来说, pH5.0 和 4.5 时降解作用非常明显,许多蛋白几乎完全降解。由此可以说明,酶粗提液中肌浆蛋白降解酶类作用的最适 pH 值应在 5.0 左右;而对于肌原纤维蛋白来说,不同 pH 值条件下都有明显的降解,说明酶粗提液中肌原纤维蛋白降解酶类作用的 pH 值范围广。电泳检测结果显示,尽管干酪乳杆菌 6033 粗酶液对肌浆蛋白及肌原纤维蛋白均表现出明显的分解作用,但在低 pH 值(5.0 左右)条件下,对肌浆蛋白的降解作用更加明显,这与徐为民等<sup>[7]</sup>的研究结果相似。

总之,干酪乳杆菌 6033 粗酶液对肌浆蛋白及肌原纤维蛋白均表现出明显的分解作用,且酶的适合 pH 值在 5.0 左右。因此在干酪乳杆菌 6033 制作干发酵香肠过程中调节基质的 pH 值,使干酪乳杆菌 6033 蛋白酶发挥最佳作用,从而促进肌肉蛋白的降解。

#### 参考文献:

- [1] Ralf G B, Carlos M, et al. Isolation and identification of dry salami volatiles[J]. J Food Sci, 1990, 55(5): 1239-1246.
- [2] Anders P H, Louise H S. Sensory and chromatographic evaluations of water soluble fraction from dried sausages[J]. J Agric Food Chem, 1997, 45: 2679-2684.
- [3] Astiasaran I, Villanueva R, et al. Analysis of proteolysis and

protein insolubility during the manufacture of some varieties of dry sausage[J]. Meat Sci, 1990, 28: 111-117.

- [4] Garcia de Fernando J L, Fox P F. Study of proteolysis during the processing of a dry fermented pork sausage[J]. Meat Sci, 1991, 29: 367-383.
- [5] 王俊, 黄明, 周光宏, 等. 干酪乳杆菌蛋白酶的的性质研究[J]. 食品工业科技, 2003, 24(7): 56-58.
- [6] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] 徐伟民, 周光宏, 等. 干发酵香肠发酵剂选择及其工艺研究[J]. 南京农业大学硕士论文, 2001, 8.
- [8] Huff-Lonergan, et al. Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine longissimus muscle[J]. J Anim Sci, 1995, 73: 1064-1073.
- [9] Fidel T, Elias R, Jose F. Cathepsin B, D, H and L activities in the processing of dry-cured ham[J]. J Sci Food Agric, 1993, 62: 157-161.
- [10] Eva H L, Juan A O. Contribution of the microbial and endogenous enzymes to the free amino acid and amine content of dry fermented sausage[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47: 1156-1161.
- [11] Montel M C, Seronine M P, Talon R, et al. Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus sake*[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 61: 837-839.
- [12] Sanz Y, Mulholland, Toldra F. Purification and characterization of a tripeptidase from *Lactobacillus sake*[J]. J Agric Food Chem, 1998, 38: 331-352.
- [13] Sanz Y, Toldra F. Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus sake*[J]. J Agric Food Chem, 1997, 45: 1552-1558.
- [14] Silvina F, Yolanda S, Graciela V, et al. Hydrolysis of pork muscle sarcoplasmic proteins by *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(2): 578-584.
- [15] Silvina F, Yolanda S, Graciela V, et al. Characterization of muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysis caused by *Lactobacillus plantarum*[J]. Appl Environ Micro, 1999, 65: 3540-3546.
- [16] Molly K, Demeyer D, Johansson G, et al. The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages, First results of an European project[J]. Food Chem, 1997, 59: 539-545.
- [17] Fadda S, Vignolo G, Holgado A, et al. Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry-fermented sausages on muscle sarcoplasmic proteins[J]. Meat Science, 1998, 49: 11-18.
- [18] Fadda S, Sanz Y, Vignolo G, et al. Characterization of muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysis caused by *Latobacillus plantarum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(8): 3540-3546.
- [19] Sanz Y, Fadda S, Vignolo G, et al. Hydrolytic action of *Lactobacillus casei* CRL 705 on pork muscle sarcoplasmic and myofibrillar proteins[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47: 3441-3448.
- [20] Kunj E, Mierau I, Hagting A, et al. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 1996, 70: 187.