

重组牛乳铁蛋白 N 末端多肽对真空包装猪肉品质的影响

罗红霞^{1,2}, 林少华¹, 任发政^{1,*}, 陈历水³, 陈雅松¹, 田寒友¹

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院功能乳品重点实验室, 北京 100083;
2. 北京农业职业学院, 北京 102442; 3. 新疆农业大学食品科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要:以 Nisin 和乳酸作为参照, 采用本试验室获得的重组牛乳铁蛋白肽对生鲜猪肉进行保藏试验。生鲜猪肉浸沾并真空包装后置于 4℃ 下存放, 测定肉样的微生物数、抗氧化值(TBA)、pH 值、肉的红度值(Hunter a*)及感官评价。结果显示, 重组的牛乳铁蛋白肽保鲜效果优于 Nisin 组, 接近乳酸组。其保鲜期可达到 19d。

关键词:重组牛乳铁蛋白肽; 猪肉; 真空包装; 品质

Studies on Recombinant Bovine Lactoferrin N-terminal Peptide on Quality of Vacuum-packed Pork

LUO Hong-xia¹, LIN Shao-hua^{1,2}, REN Fa-zheng^{1,*}, CHEN Li-shui³, CHEN Ya-song¹, TIAN Han-you¹
(1. Key Lab of Functional Dairy, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 2. Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing 102442, China;
3. College of Food Science, Xinjiang Agricultural University, Urumchi 830052, China)

Abstract: Fresh raw pork was treated with natural preservative solution made of recombinant bovine lactoferrin N-terminal peptide, Nisin and lactic acid. Raw pork were dipped in peptide, Nisin and lactic acid with concentration 1% respectively, then vacuum-packaged and placed at 4℃, to assay microbial count, TBA value, pH value, Hunter a* and sensory value respectively. Results presented that the recombinant bovine lactoferrin N-terminal peptide shows better antimicrobial activity than the Nisin

收稿日期: 2006-04-30

*通讯作者

基金项目: 北京市教育委资助项目(GJSY10090401)

作者简介: 罗红霞(1962-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为功能乳品、肉品科学。

物歧化酶(SOD)均要优于 CK 处理, 有利于保持果实的硬度, 提高果实的抗衰老能力, 提高桐柏大枣的贮藏性能。这一结果丰富了枣果气调贮藏的研究基础, 为进一步探讨气调贮藏在桐柏大枣上的应用提供了参考。

研究表明, CA 贮藏桐柏大枣对淀粉酶活性没有显著影响, 但能够降低多聚半乳糖醛酸酶(PG)活性低。CA 贮藏的 PPO 活性高于 CK, 具有诱发褐变的可能性。CA 贮藏可以有效地保持过氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)的活性, 有利于延缓衰老进程。

参考文献:

[1] 郑芳, 邵明丽, 潘志科. 桐柏大枣及其丰产栽培技术[J]. 河南农业科

学, 2005, (2): 61-62.

[2] 祁寿椿, 王春生, 阎惠珍, 等. 鲜枣贮藏研究(I)—鲜枣的耐贮品种、采收成熟度及贮藏条件[J]. 园艺, 1984, (3-4): 30-33.

[3] 梁小娥, 王三宝, 赵迎丽, 等. 枣采后果肉软化的生化和细胞超微结构变化[J]. 园艺学报, 1998, 25(4): 333-337.

[4] 宗亦臣, 王贵禧, 冯双庆. 冬枣气调贮藏试验初报[J]. 食品科学, 2003, 24(10): 150-153.

[5] 宋振基. 桐柏大枣贮藏保鲜技术研究[D]. 北京: 中国人民大学硕士学位论文, 2003.

[6] 韩雅珊. 食品化学实验指导[M]. 中国农业大学出版社, 1996. 201.

[7] P K Andrews, S L Li. Cell wall hydrolytic enzyme activity during development of nonclimacteric sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit[J]. J Hort Sci, 1995, 70(4): 561-567.

[8] Kellogg E W, Fridovich I. Superoxide hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by axanthine oxidase[J]. J Biol Chem, 1975, 250: 8812-8817.

and close to the result of lactic acid treatment. The pork can be kept well up to 19d at 4℃.

Key words: recombinant bovine lactoferrin N-terminal peptide; raw pork; vacuum pack; natural preservative

中图分类号: S879.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)06-0237-05

肉类变质的主要原因是微生物的繁殖和脂肪的氧化所致, 可以造成肉的颜色风味以及由于蛋白等的分解而产生的 pH 的变化, 微生物总数和硫代巴比妥酸值(TBA 值)是反应肉的腐败和氧化的重要指标; 色泽、风味、弹性和汁液是评定肉的感官好坏的指标。

牛乳铁蛋白(LF)和牛乳铁蛋白肽(bLF)的抗菌研究目前有很多的报道^[1], 主要是利用天然提取的和化学合成的 LF 和 bLF 对微生物的抑制研究, 研究证明 LF 和 bLF 对诸多微生物均有抑制作用; 尤其是 bLFCin(牛乳铁蛋白肽 17~41)具有较强的抗菌活力^[1,2]。研究抗菌肽的最终目的是能够将这种功能肽应用到生产实践中, 尤其是农业和医药领域。本试验将重组得到的基因工程肽在新鲜的猪肉上进行抗菌保鲜研究, 同时以目前应用于肉的抗菌保鲜作用的细菌素 Nisin 和乳酸作为试验参照, 以求进一步证实重组 rLF-N 在食物中的抗菌功能和可应用性, 为今后在实际生产中扩大应用提供有力可靠的基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

生鲜猪肉 北京资源亚太食品有限公司; 重组乳铁蛋白肽 教育部乳品功能重点实验室; Nisin 为食品级; 乳酸为分析纯; 真空复合包装袋 中国肉类研究中心。

主要仪器设备:

生化培养箱(LRH-150B) 广东省医疗器械厂; 超净工作台 北京半导体设备一厂; 微生物多用培养箱(WDP) 北京六一仪器厂; 恒温磁力搅拌器(85-2) 上海县曹行无线电元件厂; 型色差仪(TC-P2A) 北京鑫奥依克光电技术有限公司; 电热恒温水浴锅(HH-511-2) 北京长安科学仪器厂; 真空包装机; pH 计(pH 211) 意大利; 万分之一电子天平(YLE-100) 德国。

1.2 方法

1.2.1 生鲜肉的准备和处理

将购买的新鲜猪肉在低温条件下(4℃)分割成 50g 重量大小的样品, 分别在预先配置好的各种处理液中浸沾 30s, 取出风干后真空包装, 置于冷藏条件下存放, 定期抽样检测相关的质量指标。每次抽样做 3 个重复。检测的质量指标主要为细菌总数、pH 值、TBA(硫代巴比妥酸)值和感官色差值。

1.2.2 保鲜液的选择和配置

根据试验的需要, 本次试验我们以重组的乳铁蛋白

肽作为主要的试验对象, 同时选择了乳酸、Nisin 作为试验的参照物, 将各试验保鲜剂配置成 3 个不同的工作浓度, 对鲜肉分别浸沾后, 低温条件下放置 7d, 进行初步的保鲜试验, 即分别在第 4d 和第 7d 测定生肉的微生物对数值和感官指标, 根据初试结果和试验目的, 选定一个有效的、能够反映效果的最低浓度作为试验工作浓度, 以此浓度对生鲜肉进行保鲜实验, 并定期对各项指标进行测定。空白组是将分割好的鲜肉在低温下直接真空包装后与试验组一起放置在实验温度(4℃)。试验浓度见表 1。

表 1 初步试验选择的各保鲜液的浓度
Table 1 Preservative solution selection

名称	试验浓度(%)		
空白			
rbLF-N 酶解液	1	3	5
Nisin	1	3	5
乳酸	1	3	5

注: 每一处理重复 3 次。

1.2.3 保鲜试验中肉的微生物测定

参照国家标准 GB-4789.2-1996^[3]。称取样品 25g, 无菌剪刀剪碎后, 放入 225ml 的无菌生理盐水中, 摇床中振摇 30min, 取 1ml 上清液进行 10 倍递增稀释, 采用平板倾注法计数, 共设三个稀释度, 每个稀释度三个平行。

1.2.4 保鲜试验中肉的 TBA 值的测定

猪肉的 TBA 值的测定方法^[4]: 称取 10g 肉样, 置于 100ml 的三角瓶内, 加入 50ml 的三氯乙酸-EDTA(含 0.1% 的 EDTA)混和液, 振摇 30min, 用双层滤纸过滤两次, 准确称取上述滤液 5ml, 加入 5ml 0.02mol/L TBA 溶液, 90℃水浴中保温 40min, 取出冷却 1h 后离心 5min (240 × g), 上清液中加入 5ml 氯仿摇匀, 静置分层后取上清液, 分别在 532nm 和 600nm 比色, 记录消光值, 并用以下公式计算 TBA 值。

$$\text{TBA}(\text{mg}/100\text{g}) = \frac{A_{532} - A_{600}}{155} \times \frac{1}{10} \times 72.6 \times 100$$

1.2.5 保鲜肉 pH 值测定

pH 值的测定^[5]: 取 5g 样于 50 ml 灭菌蒸馏水中匀浆, 用滤纸进行过滤, 滤液用 pH 计测定其 pH 值。

1.2.6 保鲜肉的感官评定

1.2.6.1 感官评分测定方法^[6]: 采用 6 点标度, 4 个评

分项目分别对试验样品进行打分评定,数据编码为1~6的得分。选定20名相关专业的硕士和博士作为评判员。4个项目分别为:色泽、风味、汁液和弹性。

1.2.6.2 仪器色差分析^[7]:采用TC-P2A型全自动侧色色差计对各实验组样品进行颜色(红度值)测定和分析。仪器校正好(标准化),测定样品表面平整。

2 结果与分析

2.1 保鲜液工作浓度的确定

通过对rbLF-N、Nisin和乳酸各3个不同浓度的初步筛选,在浓度为1%的水平上已经显示出很明显的效果,因此,根据试验的目的,选择相对低的浓度(1%)作为保鲜试验的工作浓度,来反映和评价同一浓度、同样条件下的保鲜抗菌效果。

2.2 样品在存放过程中微生物分析

试验样品在保鲜过程中,定期抽样检测,试验结果见图1。

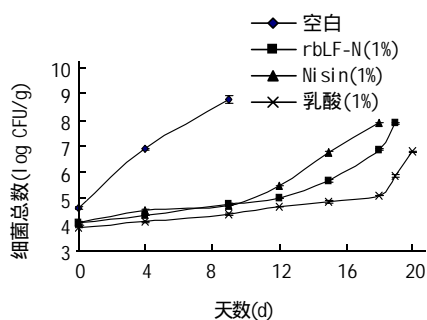


图1 保鲜液处理的生鲜猪肉在4℃下存放20d细菌总数的变化

Fig.1 Bacterial count for 20d at 4℃ with natural preservative solution

由图1分析,试验组处理的肉样均比空白组保存期要长,空白组在4d时,细菌总数达到了 $6.88 \pm 0.03 \log \text{CFU/g}$,而1% Nisin、1% rbLF-N和1%乳酸处理的肉样在第15d、第19d和第20d时,其细菌总数分别为 6.77 ± 0.10 、 6.87 ± 0.03 和 $6.79 \pm 0.10 (\log \text{CFU/g})$,分别比对照延长了11、14和16d,差异显著($p < 0.05$);试验组中,以1%乳酸处理的肉样保存时间最长为20d,在第18d时,与其他两个试验组相比,差异显著($p < 0.05$);rbLF-N 1%处理得肉样比1% Nisin处理的肉样的保鲜效果要好,差异显著($p < 0.05$)。

2.3 试验样品在放置过程中的TBA值的变化

供试样品在放置过程中,定期抽样检测其TBA值,检测结果见图2。由图2分析,试验各组在存放过程中的TBA值均小于空白组,在放置15d时,空白组的TBA值为 0.68 ± 0.03 ,已经呈现氧化变质状态,而1% rbLF-N、1% Nisin和1%乳酸在15d时TBA值分别为

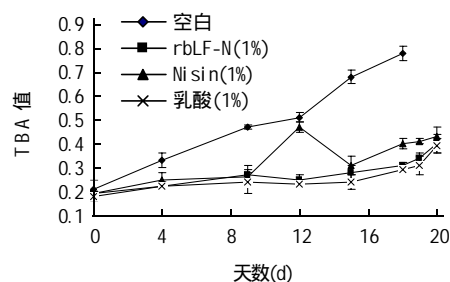


图2 保鲜液处理的生鲜猪肉在4℃下存放20d TBA值变化

Fig.2 TBA value for 20d at 4℃ with natural preservative solution

0.28 ± 0.03 、 0.31 ± 0.10 和 0.24 ± 0.03 保持了相对较低的水平,与对照相比较,其差异极显著($p < 0.01$);各试验组之间也存在显著的差异($p < 0.05$)。在20d时,其TBA值分别为 0.40 ± 0.04 、 0.43 ± 0.13 和 0.39 ± 0.07 ,经检测试验组之间没有显著性差异($p > 0.05$);因此,用1% rbLF-N、1% Nisin和1%乳酸对生鲜猪肉浸沾处理后于真空包装4℃贮藏,其抗氧化的能力基本是相同的。

2.4 试验样品在放置过程中pH的变化

供试样品在保存过程中,定期抽样测定pH值,测定结果见图3。

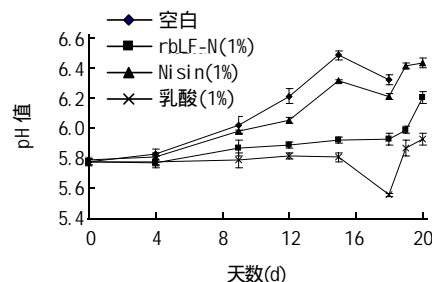


图3 保鲜液处理的生鲜猪肉在4℃下存放20d pH值的变化

Fig.3 pH value for 20d at 4℃ with natural preservative solution

由图3分析,空白组在存放至第12d时,已经有较为明显的异味,其pH值达到 6.21 ± 0.05 ;试验组与对照组之间存在显著性差异($p < 0.05$),各组之间也存在着显著性差异($p < 0.05$),1% Nisin在第12d时其pH值为 6.05 ± 0.12 ,无明显异味;1% rbLF-N处理的肉样在19d时pH值为 5.99 ± 0.02 ,没有明显异味;1%乳酸处理的肉样在20d时pH值为 5.93 ± 0.04 ,肉样没有异味;1% rbLF-N、1% Nisin和1%乳酸处理的肉样在20d时pH值分别为 6.20 ± 0.04 、 6.43 ± 0.13 和 5.93 ± 0.04 ,Nisin处理的肉样有轻微的异味,rbLF-N和乳酸处理的肉样没有异味,各组之间存在差异显著($p < 0.05$)。

2.5 试验样品在放置过程中感官指标的变化

供试样品在放置过程中,定期抽样检测其感官指标,抽测的样品在打开包装后1h,进行评定,检测结果见图4(a-d),感官评定的数据为20个评定者的平均值。

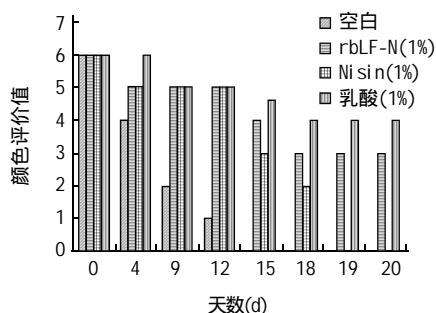


图 4(a) 保鲜液处理的生鲜猪肉在 4 下存放 20d 颜色的变化
Fig.4(a) Color value for 20d at 4 with natural preservative solution

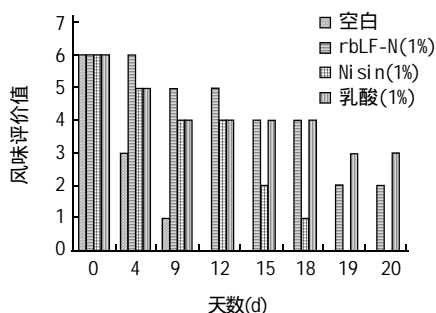


图 4(b) 保鲜液处理的生鲜猪肉在 4 下存放 20d 风味的变化
Fig.4(b) Flavor value for 20d at 4 with natural preservative solution

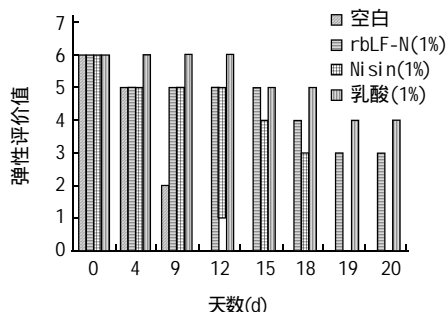


图 4(c) 保鲜液处理的生鲜猪肉在 4 下存放 20d 弹性的变化
Fig.4(c) Elasticity value for 20d at 4 with natural preservative solution

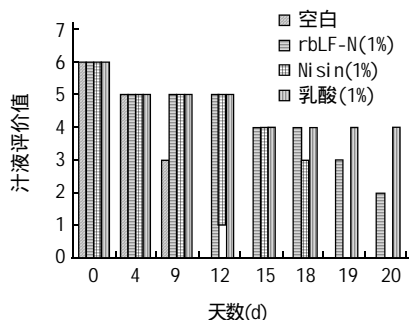


图 4(d) 保鲜液处理的生鲜猪肉在 4 下存放 20d 汁液的变化
Fig.4(d) Juice value for 20d at 4 with natural preservative solution

由图 4 分析,在对 4 组试验样品的感官评定中,空白组在放置第九天时,各项指标已达到了最低限,风味、色泽均已产生很大的变化,有明显的异味,颜色不能够被接受;1% Nisin 组在第 15d 时风味已基本不能被接受;带有些许异味;1% rbLF-N 组在放置第 19d 时,有异味产生,颜色和弹性下降,汁液增加;1% 乳酸组在 20d 时,其样品的色泽、弹性和汁液方面仍保持了良好的状态,在风味方面也达到了可以接受的程度。

2.6 色差分析

定期抽检的肉样用色差仪分析数据结果见图 5。

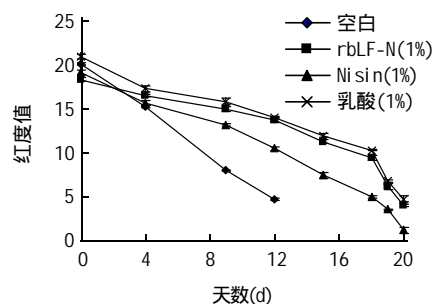


图 5 保鲜液处理的生鲜猪肉在 4 下存放 20d 红度值(Hunter a*)的变化
Fig.5 Hunter a* value for 20d at 4 with natural preservative solution

由图 5 分析,所有的处理组,肉色的红度值随着存放期的延长而降低;空白组在 0、4d 时保持了较高的红度值,分别为 20.12 和 15.25;在第 9d 时下降到 8.03,在第 14d 时达到 4.78,已经变暗;rbLF-N 组和乳酸组在整个试验期中保持了较高的水平,乳酸效果更好些,有显性差异($p < 0.05$);Nisin 组在前 9d 有较好的红度,但在 12d 以后有较大的下降,与其他两个试验组相比,有明显的降低,差异显著($p < 0.05$);对照组在第九天的红度值与 3 个试验组相比,有明显的降低,差异极显著($p < 0.01$)。

在对乳铁蛋白及其多肽的功能研究上,学者们在证明了 LF 具有独特的生理调节代谢功能,增强铁的传递和利于人体吸收,消炎、抗氧化、抗病毒、增强免疫作用、促进肠道菌群的平衡外,认为最重要的生理功能是广谱抗菌性^[8]。bLF 经猪胰蛋白酶水解得到的小分子多肽能够显著抑制革兰氏阳性菌(G^+)和革兰氏阴性菌(G^-)的生长,其抑菌活性强于 LF^[9];对 LF 分子的 N 端分离,得到了人乳和牛乳乳铁蛋白的活性多肽(bLFcin 和 hLFcin),其抗菌活性远高于 LF,并且 bLFcin 的抗菌活性比 hLFcin 强^[1]。在我们的试验中,通过对 LF-N 末端基因的表达得到的融合蛋白,在经过复性处理后^[10],经过胃蛋白酶的水解,对四种菌(G^+ 和 G^- 各两个)进行了活性检测,证明具有较好抗菌活性^[11],而酶解前不具有这种活性,这可能是在胃蛋白酶解后产生了具有抗菌功能

的小分子肽。研究认为,这种小分子肽可能的空间构象为扭曲的反向平行的 β -折叠状,与LF的 α -螺旋结构不同,由 α -螺旋向 β -折叠状构象的转换,可能是导致抑菌性能增强的重要原因, β -折叠状更易于贴近细菌的表面^[12]。由于小分子肽带有正电荷,能够与G⁻菌细胞膜表面带有负电荷的磷脂多糖强有力的亲和,增强了微生物细胞膜的通透性^[13],脂多糖的释放,导致细胞质膜生理功能的彻底破坏,微生物致死^[14,15]。试验还显示,G⁺菌与G⁻菌对小分子肽的敏感度有一定差异,G⁻菌相对更敏感些,这可能是G⁺菌与G⁻菌所带有的磷酸脂质体和脂多糖的结构和数量不同,对小分子肽的敏感性不同所致^[16]。

3 结 论

用重组牛乳铁蛋白肽rbLF-N酶解液对新鲜猪肉进行保鲜试验,获得较好的效果,与参照组Nisin和乳酸组相比较,保鲜效果优于Nisin组,接近于乳酸组;rbLF-N具有天然的bLF抗菌活性,安全无公害,并能够进行规模化的生产。

参考文献:

- [1] Bellamy W, Takase M, Wakabashi K. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1992b, 73: 472-479.
- [2] Bellamy W, Takase M, Yamaudhim K, et al. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1992a, 1121: 130-136.
- [3] 中华人民共和国国家标准GB4789.2-1994[S]. 食品卫生微生物学检

验

- [4] Schmedes A, Holmer G. A new thiobarbituric acid (TBA) method for determination of free malonaldehyde (MDA) and hydroperoxides selectively as a measure of lipid peroxidation[J]. Journal of American Oil Chemistry Society, 1989, 66: 813-817.
- [5] Han J, Rhee K S. Antioxidant properties of selected Oriental non-culinary/nutritional herb extracts as evaluated in raw and cooked meat[J]. Meat Science, 2005, 70: 25-33.
- [6] Harry T L, Hildegarde, Heymann. Sensory evaluation of food principles and Practices[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2001.
- [7] Hunter R S, Harold R W. The measurement of appearance[M]. New York: John Wiley and Sons, 1987.
- [8] Shimazaki K. Separation and utilization of bovine lactoferrin[J]. Japanese Journal of Dairy and Food Science, 1989, 38: 277-283.
- [9] Tomita M. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin[J]. Journal Dairy Science, 1991, 74 (12): 4137-4142.
- [10] 林少华, 罗红霞, 郭慧媛, 等. 重组牛乳铁蛋白肽包含体的复性与纯化[J]. 中国乳品工业, 2006, 34(1): 9-12.
- [11] 罗红霞, 郭慧媛, 林少华, 等. 鲁西黄牛乳铁蛋白N-末端多肽基因的表达与活性检测[J]. 中国乳品工业, 2005, 32(12): 4-7.
- [12] Hwang P M, Zhou N, Arrowsmith C H, et al. Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin[J]. Biochemistry, 1998, 37: 4288-4298.
- [13] Schroder G, Brandenburg K, Seydel U. Polymyxin B induces transient permeability fluctuations in asymmetric planar lipid bilayers[J]. Biochemistry, 1992, 31: 631-638.
- [14] Shimazaki K, Tazuke T, Uji K. Properties of a heparin-binding peptide derived from bovine lactoferrin[J]. Journal Dairy Science, 1998, 81: 2841-2849.
- [15] Ellison R T, Laforce F M, Giehl T J. Lactoferrin and transferring damage of the Gram negative outer membrane is modulated by Ca²⁺ and Mg²⁺[J]. Journal General Microbiology, 1990, 136: 1437-1446.
- [16] Rana F R, Macias E A, Sul tany C M. Interactions between magainin 2 and *Salmonella typhimurium* outer membranes effect of lipid polysaccharide structure[J]. Biochemistry, 1991, 30: 5858-5866.

信 息

牛奶中青霉素类残留微生物学快速检测方法问世

华中农业大学的“牛奶中青霉素类残留微生物学快速检测方法及试剂盒研究”成果11日在武汉通过了农业部鉴定。这项“十五”国家科技攻关项目子课题填补了国内空白,整体技术水平达到国际先进,预期具有良好的社会效益和经济效益。

“牛奶中青霉素类残留微生物学快速检测方法及试剂盒”项目由国家兽药残留基准实验室和农业部食品安全评价重点实验室的袁宗辉教授等主持完成。袁宗辉教授为首的课题组针对牛奶中青霉素类药物残留问题,建立了检测牛奶中青霉素类残留的微生物学快速筛选方法,研制出适合牛奶中青霉素类药物残留快速检测试剂盒,经稳定性、交叉反应和动物残留等试验,该试剂盒的灵敏度、假阳性率等性能指标与意大利试剂盒(Copan Milk Test)一致;与仪器分析法-高压液相色谱法(HPLC)具有良好的相关性。经湖北省有关法定检测机构复核和应用,该试剂盒的灵敏度、特异性和假阳性率等指标能满足青霉素类药物残留的检测要求。