

溶菌酶高分子复合抗菌材料的研究进展

梁勋, 胡杰, 汪乐川, 况海锐, 陈阳, 李真顺*
(长江大学 生命科学学院, 湖北 荆州 434025)

摘要:溶菌酶(lysozyme, Lyz)是一种高效抑菌剂,是食品中重要的天然防腐剂,但局限性也很明显。作为蛋白质,溶菌酶活性不稳定,不能很好地适用于各种复杂的体系。为增强其使用稳定性,国内外学者对溶菌酶的固定化进行了深入的研究。文章主要综述将溶菌酶与高分子物质结合,通过膜固定得到抗菌薄膜,用于食品物料的包装与保护;利用纳米微凝胶技术制得便于储存的溶菌酶复合物,提高溶菌酶的活性和利用效率及美拉德反应产生的共轭复合物对几种常见致病菌的抑制作用,同时展望溶菌酶高分子复合抗菌材料良好的发展前景。

关键词:溶菌酶;复合物;膜材料;包装材料;纳米技术

Research Progress of High Molecular Polymer in Lysozyme Immobilization

LIANG Xun, HU Jie, WANG Le-chuan, KUANG Hai-rui, CHEN Yang, LI Zhen-shun*
(College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei, China)

Abstract: Lysozyme (Lyz) is a highly effective bacteriostatic agent and an important natural preservative in foods, but its limitations are also obvious. As a protein, lysozyme activity is unstable and cannot be well applied to various complicated systems. In order to enhance the stability of its use, domestic and foreign scholars have conducted in-depth research on the immobilization of lysozyme. In this paper, the combination of lysozyme and high molecular substances was reviewed. The antibacterial film was obtained by membrane fixation, which was used for packaging and protection of food materials. The nano-microgel technology was used to prepare lysozyme complex for storage and to improve the activity and efficiency of lysozyme. The conjugated complex produced by the Maillard reaction was used to inhibit several common pathogenic bacteria, and the development prospect of lysozyme polymer composite antibacterial material was prospected.

Key words: lysozyme; complex; membrane material; packaging material; nanotechnology

基金项目: 国家自然科学基金(31701624)

作者简介: 梁勋(1995—),男(汉),硕士,研究方向:蛋白质与多糖的相互作用。

* 通信作者: 李真顺(1978—),女,副教授,研究方向:蛋白质与多糖的相互作用。

[41] 唐秋实,刘学铭,陈智毅,等.金针菇的酶解工艺及热反应风味成分分析[J].中国食品学报,2016,16(2): 91-97

[42] HEIKKI A, JUHA S, ANU H, et al. Odor-contributing volatile compounds of wild edible Nordic mushrooms analyzed with HS-SPME-GC-MS and HS-SPME-GC-O/FID[J]. Food Chemistry, 2019, 283: 566-578

[43] XIAO C, JINGYANG Y, HEPING C, et al. Effect of Temperature on Flavor Compounds and Sensory Characteristics of Maillard Reaction Products Derived from Mushroom Hydrolysate[J]. Molecules, 2018, 23(2): 247

[44] MISHARINA TA, MUHUTDINOVA SM, ZHARIKOVA GG, et al.

Formation of flavor of dry champignons (*Agaricus bisporus* L.)[J]. Applied Biochemistry & Microbiology, 2010, 46(1): 108-113

[45] 赵立娜,陈紫红,于志颖,等.利用双孢蘑菇蛋白酶解液制备呈味基料的研究[J].食品研究与开发,2017,38(23): 77-81

[46] 张历.基于美拉德反应的真姬菇调味品的研究[D].福州:福建农林大学,2015

[47] 李佳佳.秀珍菇水解物美拉德反应制备调味核心基料的研究[D].无锡:江南大学,2017

[48] 李超.鸡腿菇多肽-果糖美拉德反应制备抗氧化剂及其应用研究[J].食品工业,2017,38(10): 87-93

收稿日期: 2019-07-03

引文格式:

梁勋,胡杰,汪乐川,等.溶菌酶高分子复合抗菌材料的研究进展[J].食品研究与开发,2020,41(15):193-200

LIANG Xun, HU Jie, WANG Lechuan, et al. Research Progress of High Molecular Polymer in Lysozyme Immobilization[J].

Food Research and Development, 2020, 41(15): 193-200

1 溶菌酶的结构特点及抑菌特性

溶菌酶(lysozyme, Lyz)又称 N-乙酰胞壁质聚糖水解酶或胞壁质酶,具有良好的生物相容性,能在不破坏机体的前提下有效杀伤病原微生物,但目前应用最多的是 C、G 型两种。C 型蛋清溶菌酶由 18 种 129 个氨基酸残基构成,分子量大约为 14 300 u,内部存在 4 个二硫键,在一定的压力和高温条件下二三级结构不会改变,因此溶菌酶比其它蛋白更稳定^[1]。

溶菌酶是自然界中广泛存在的天然抗菌物质,在蛋清中含量最丰富,在食品中已经有广泛的应用。溶菌酶的作用是破坏 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰氨基葡萄糖之间的 β -1,4 糖苷键,降低细胞壁稳定性,导致胞壁内外渗透压不平衡而发生破裂,内容物溢出,细菌溶解死亡。革兰氏阳性菌细胞壁的主要成分是肽聚糖,但革兰氏阴性菌细胞壁有很厚的多糖类物质在外层,多糖阻碍了溶菌酶对肽聚糖的裂解,因此溶菌酶对革兰氏阴性菌的杀菌效果不明显。

近几年,国内外学者在溶菌酶的化学修饰、物理改性、固载及纳米材料方面的探索研究已有一定的报道^[2-4],将溶菌酶与其他高分子材料结合,形成复合物可增加溶菌酶的应用场景,针对不同的使用情况可灵活变换,溶菌酶涂层可在固体物料表面使用,纳米材料微胶囊等可在液体物料中使用,溶菌酶复合材料可对溶菌酶进行控释,防止溶菌酶的流失,提高溶菌酶活性、利用率和杀菌效率。因此复合材料可极大地拓宽溶菌酶的适用范围。

2 溶菌酶高分子复合物抗菌膜材料

将溶菌酶与其他高分子聚合物结合形成薄膜,附着溶菌酶后的薄膜可应用在食品包装或直接应用于食品物料的表面涂层,这种薄膜或涂层在抗菌的同时还兼具防水透气的效果,可有效保护物料,提高溶菌酶的使用率,节约成本。

多糖和蛋白质是目前应用最广泛的生物高分子物质,天然多糖和蛋白质自组装体系能作为食品和药物载体,并且方法简便,反应条件温和,无任何有毒表面活性剂、交联剂等物质,具有潜在的应用价值。在特定条件下,多糖分子的还原末端能和蛋白质分子氨基

酸侧链的自由氨基发生美拉德反应,形成多糖-蛋白质的复合物。能有效提高蛋白质的功能特性,比如起泡性、乳化性等。

2.1 溶菌酶胶原蛋白复合物

溶菌酶和胶原蛋白有利于食品物料的保鲜,Wang 等^[5]将胶原蛋白与溶菌酶结合制作出一种可食用的涂层,鲑鱼经过 4 种不同浓度的胶原溶菌酶处理后,在 4℃下冷藏 15 d,在储存期间对其进行物理、化学、微生物学和感官分析,最后发现所有的处理都显著提高了新鲜鲑鱼片的保鲜质量,更好地抑制了细菌的生长,且对减少样品的重量损失具有很好的效果。胶原分子外存在大量的亲水羧基和羟基,它们与水蒸气分子之间可以形成氢键,能有效地阻止水蒸气从样品中蒸发,使样品表面保持更多的水分。

2.2 多酚修饰溶菌酶

用儿茶素-溶菌酶复合物(catechin and lysozyme combination, CLC)掺入明胶薄膜和聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)薄膜包裹碎猪肉,在 4℃下冷藏 7 d,发现用儿茶素溶菌酶明胶薄膜(catechin-lysozyme incorporated gelatin film, CLGF)包裹的样品表现出较少的重量损失和脱色,CLGF 可以成功抑制冷藏猪肉中的脂质氧化和微生物生长,延长其保质期^[6]。使用儿茶素能有效地使薄膜增塑,儿茶素还提供了膜的抗氧化性,该膜显示出对李斯特菌的抗菌活性。通过该方法获得的薄膜具有柔韧性和抗菌抗氧化性及控释性能。

使用儿茶素与溶菌酶结合作用于鱼明胶膜,没有添加 CLC 的明胶膜具有最高的亮度。随着 CLC 的增加,薄膜的透光率没有显著降低,薄膜透明度也没有显著降低($p>0.05$)。这些发现表明 CLC 掺入可以改善所得薄膜的机械、物理化学性质,从而使薄膜更适用于活性食品包装^[7]。

2.3 溶菌酶多糖复合物

溶菌酶-壳聚糖涂层在保护鸡蛋内部质量方面非常有效,将溶菌酶和壳聚糖复合,用于包覆鸡蛋,可减少鸡蛋的重量损失从而延长了保质期。壳聚糖的涂层也改善了蛋壳的强度^[8]。溶菌酶-壳聚糖涂层是活性包装,具有良好的应用前景。可以成为现有技术的可行替代品,用于在长期储存期间保持新鲜鸡蛋的内部质量。

酰化反应制备的 N-琥珀酰壳聚糖 (N-succinyl-chitosan, NSC) 与溶菌酶结合 (NSC-Lyz), 在最佳条件下溶菌酶的固载量高达 89 %^[9], 主要是由于固载后的溶菌酶与 NSC 发生共价结合导致二级结构改变, NSC-Lyz 有良好的热稳定性、抑菌活性和保鲜效果, 所制得的膜在拉伸强度、透光性、隔氧、阻水等方面也有比较好的性能。壳聚糖与溶菌酶的应用在实际生产中也有其他方面的探索, Liburdi 等^[10]和 Cappannella 等^[11]将固定在壳聚糖载体上的溶菌酶, 用于葡萄酒中的乳酸菌的连续发酵, 溶菌酶在固定化形式中比在游离形式中更有效。

溶菌酶和低甲氧基 (low methoxyl, LM) 果胶复合, 开发可食用的抗菌膜能显著降低溶菌酶抗菌活性。根据粒径和电泳迁移率 (zeta 电位) 结果显示这可能是由于溶菌酶底物扩散受限或酶迁移率降低^[12]造成的。游离离子化羧酸基团和 LM 果胶在静电相互作用下结合, 在配合物形成过程中, 一些溶菌酶阳离子位点游离于配合物表面, 使配合物之间建立起果胶桥。因此, 单个 LM 果胶分子可以通过静电桥接形成聚集与多个络合物结合, 当含有溶菌酶/LM 果胶复合物的薄膜浸入水中时, 加入产果胶分解酶的真菌, 溶菌酶活性显著增加, 这可能是由于果胶酶水解后溶菌酶从复合物中解离发挥作用导致的。

通过美拉德反应制备的溶菌酶-半乳糖甘露聚糖复合物具有良好的乳化性能和抗菌性能。半乳糖甘露聚糖与溶菌酶结合方式的美拉德反应示意图见图 1。

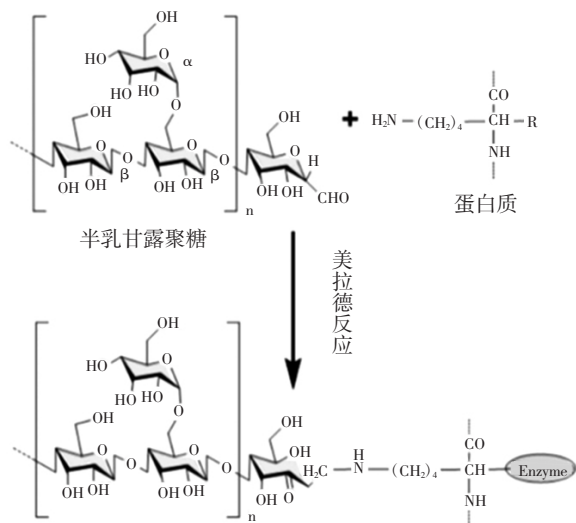


图 1 半乳糖甘露聚糖与溶菌酶结合方式的美拉德反应示意图^[13]

Fig.1 Lysozyme-galactomannan conjugate was prepared via a Maillard-type reaction^[13]

研究表明溶菌酶-半乳糖甘露聚糖 (lysozyme-galactomannan) (质量比 1 : 1, pH 9.5, 60 °C, 相对湿度

79 %) 和 *E. coli* IF0 12713 在 50 °C 条件下加热, 40 min 后大肠杆菌活菌个体全部被杀灭。通过在 260 nm 处测定培养液上清, 在有复合物存在的情况下, 吸光度显著增加^[14], 这表明, 在溶菌酶-半乳糖甘露聚糖复合物存在的情况下, 大肠杆菌细胞表面发生了不可逆损伤。

溶菌酶是一种抗菌多肽, 可用于食品保存, 与瓜尔胶等多糖的缀合可以扩大其抗革兰氏阴性菌的活性。瓜尔胶是一种亲水性多糖, 可防止蛋白质分子的沉淀与聚集, 复合物通过美拉德反应开发, 针对两种革兰氏阳性菌 (金黄色葡萄球菌和肠球菌) 和两种革兰氏阴性菌 (大肠杆菌和沙门氏菌) 测定复合物的抗菌活性。结果显示溶菌酶-瓜尔胶复合物的功能特性有显著的提高, 瓜尔胶天然的增稠作用提高了复合物的乳化性、起泡性和热稳定性, 对 DPPH 自由基的抑制率从 2.02 % 显著提高到 35.80 %, 溶菌酶-瓜尔胶复合物的还原能力显著提高到 4.93 AAE/g^[15]。

Hashemi 等^[16-17]还通过美拉德反应制备了溶菌酶 (Lyz)-阿拉伯胶 (gum Arabic, GA) 复合物 (Lyz-GA) 和黄原胶 (XG)-溶菌酶 (Lyz) 复合物 (Lyz-XG)。Lyz-GA 应用于蛋黄酱作为天然防腐剂和乳化剂。溶菌酶单独不具有广谱抗菌活性或乳化性质。但该研究表明 Lyz-GA 在蛋黄酱中的应用加速了金黄色葡萄球菌和 *E. coli* K-12 的死亡, 增加了溶菌酶在抗菌食品中的应用范围。同时 Lyz-GA 在蛋黄酱中的乳化作用也有明显提升。Lyz-XG 也表现出同样的效果, 而且起泡性也有部分提升。该成果使得天然防腐剂和乳化剂在食品工业中的应用成为可能。

在温和的美拉德反应条件下制备的黄芪胶 (tragacanthin, TRG) 和鸡蛋清溶菌酶 (Lyz) 的酶-生物聚合物复合物与天然溶菌酶相比复合物的乳化性质有显著提升。与 TRG 结合显著改善了溶菌酶对金黄色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌、大肠杆菌和伤寒沙门氏菌生长的抑制作用^[18]。

新型抗菌膜材料的使用在一定程度上会产生负面的感官效果, 由于成分大多数是高分子或有机物, 与食品物料直接接触时可能会发生微小的化学反应, 对食品本身的风味口感造成改变, 不利于食品的食用。如何做到在不影响食品感官的同时有效地发挥抗菌保鲜效果, 或开发可食用抗菌保鲜膜, 是后续研究的主要方向之一。

3 溶菌酶可控释抗菌包装材料

Gemili 等^[19]将溶菌酶掺入醋酸纤维素 (cellulose acetate, CA) 膜中, 通过调节初始浇铸溶液的组成, 将

膜的结构从高度不对称和多孔变为致密,实现溶菌酶的控制释放。含有 1.5 %溶菌酶和 5 %CA 溶液制备的薄膜在溶菌酶释放速率,可溶性溶菌酶活性和抗菌活性等方面都是最高的。随着浇铸液中 CA 含量的增加,膜的孔隙率下降,但是固定在膜中的溶菌酶活性和薄膜的抗拉伸强度增加。

采用带正电荷的溶菌酶-壳聚糖-有机累托石(organic rectorite, OREC) 复合材料和带负电荷的海藻酸钠通过逐层改性(layer-by-layer, LBL) 自组装技术,对带负电荷的电纺醋酸纤维素 (cellulose acetate, CA) 纤维毡进行多层改性^[20]。添加 OREC 的 LBL 结构纤维毡可有效抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,可以延长猪肉的保质期约 3 d。

在扩大溶菌酶的抗菌谱方面,还有直接将溶菌酶与外包装结合的方法,Barbiroli 等^[21]将抗菌蛋白溶菌酶和乳铁蛋白结合到含有羧甲基纤维素的纸张中,使带正电荷的蛋白质与纸基质非共价结合。对李斯特菌进行的试验中这两种蛋白质之间的协同作用是明显的,乳铁蛋白改变了细菌细胞膜的通透性,有利于溶菌酶更好的杀灭细菌。纸张中释放的溶菌酶保留了它们的结构和功能,表明造纸过程不影响它们的结构,释放的溶菌酶还保留了对常见食品污染物的抗菌活性。

邢易等^[22]将聚四氟乙烯 (polytetrafluoroethylene, PTFE) 高分子聚合物膜用多巴胺改性后,使溶菌酶固定在其表面上,这种薄膜对金黄色葡萄球菌的抗菌率高达 89 %。固载溶菌酶构建的 PTFE 抗菌功能膜,不仅在一定程度上保持了基体材料本身的防水透气性,而且可防止抗菌剂流失,提高溶菌酶的稳定性。

Corradini 等^[23]通过溶胶-凝胶途径制备基于聚对苯二甲酸乙二醇酯 (poly ethylene terephthalate, PET) 的抗菌活性包装,其包含作为抗菌剂的溶菌酶,是一种具有控释性质的包装膜。Ozer 等^[24]开发了基于 pH 值响应性聚丙烯酸 (polyacrylic acid, PAA)/溶菌酶 (Lyz) 复合物的新型控释系统,该膜系统适合于保持溶菌酶的抗菌活性,通过改变 PAA/Lyz 质量比和 PAA 分子量来改变复合物的性质,溶菌酶的释放时间从不到 24 h 延长至 500 h,研究发现溶菌酶与弱聚电解质的络合可用作实现持久抗菌,并且用这种复合物制备的膜作为食品包装材料具有巨大潜力。

Arcan 等^[25]使用复合和混合膜制造方法改变玉米醇溶蛋白膜的疏水性和形态来控制释放溶菌酶,在 5 %玉米醇溶蛋白中将蜂蜡掺入薄膜中,得到含有无定形蜡颗粒的复合薄膜,随着蜡的熔点增加,复合物的溶菌酶释放速率降低,复合物和混合物的溶菌酶释放速

率最低为对照的 6 %。蜂蜡的加入显著提高了玉米醇溶蛋白的抗拉伸强度,在针对李斯特菌进行的抗菌效果测试中发现其抗菌性及抗氧化性都得到了提高,通过使用玉米醇溶蛋白可以生产具有控释性能的柔性抗菌和抗氧化薄膜。

Hanušová 等^[26]通过 Ugi 反应将葡萄糖氧化酶和溶菌酶与环己基异氰化物和戊二醛固定在聚酰胺和离子膜上,结果表明固定化溶菌酶后的膜在琼脂培养基上能抑制细菌 *E. coli* CNCTC 6859, 荧光假单胞菌 CNCTC 5793, 瑞士乳杆菌 CH-1, 李斯特菌 *ivanovii* CCM 5884 和李斯特菌无害 CCM 4030 的生长。

可控释膜材料一般具有疏松多孔的内部结构,这就导致在膜的厚度上有先天劣势,厚度增加会使得重量也相应增加,降低了机械性能,与传统保鲜膜相比较脆弱、易破损、抗拉伸能力较弱、防水能力不够优秀。可控释抗菌膜材料的轻量化研究值得进一步深入探讨,增强机械性能,保证一定的抗拉伸强度,有利于抗菌膜长期有效保护物料的品质。同时目前研究的可控释抗菌膜大多数只具备单一条件下的控释性能,在复杂的运输储藏销售环节中,环境条件多变,开发可灵活调控释放抗菌物质的膜材料具有广阔的市场及应用前景。

4 溶菌酶纳米材料

有机高分子微凝胶与溶菌酶结合极大地增强了溶菌酶的活性、抑菌性,便于储存且在长时间的储存过后溶菌酶仍能保持较高的活性。纳米材料比表面积非常大,表面能量高,少量的纳米材料就能吸附大量溶菌酶,同时微凝胶等纳米材料易于在体系中扩散,能更充分地发挥溶菌酶的抗菌效果。纳米技术能提高溶菌酶的抑菌作用时长,拓展溶菌酶纳米材料在食品中的应用范围。

纳米材料逐步应用于各个领域,在食品工业中也表现出巨大的潜力,有纳米凝胶、纳米纤维等^[27]。静电纺丝是目前有效制备纳米纤维的方法之一^[28-30]。电纺纳米纤维膜具有很高的表面积比、体积比和高孔隙率等特点,在食品科学领域有极大的发展潜力^[31-33]。

4.1 纳米凝胶及微球

以 Fe_3O_4 作为磁核,聚乙二醇 6000 (polyethylene glycol, PEG 6000) 作为分散剂,羧甲基壳聚糖 (carboxymethyl chitosan, CM-CTS) 作为表面壳体材料制备的功能性超顺磁性纳米颗粒 Fe_3O_4 (PEG+CM-CTS),通过静电相互作用对血清中的溶菌酶进行分离纯化,得到较高纯度的溶菌酶,且该方式高效、成本低、吸附容

量高。明显优于传统溶菌酶的分离纯化技术。研究表明溶菌酶与超顺磁性纳米颗粒 Fe_3O_4 (PEG+CM-CTS)之间产生了稳定的复合物,较好地维持了蛋白质的构象,活性保留率高达 92.4 %,高于自然状态下的溶菌酶^[34]。

Welsch 等^[35]将溶菌酶在 pH 7.2 的带负电的核-壳微凝胶上吸附。载体颗粒由聚苯乙烯核心组成,其上连接有带电荷的聚 N-异丙基丙烯酰胺-共-丙烯酸网络,见图 2。

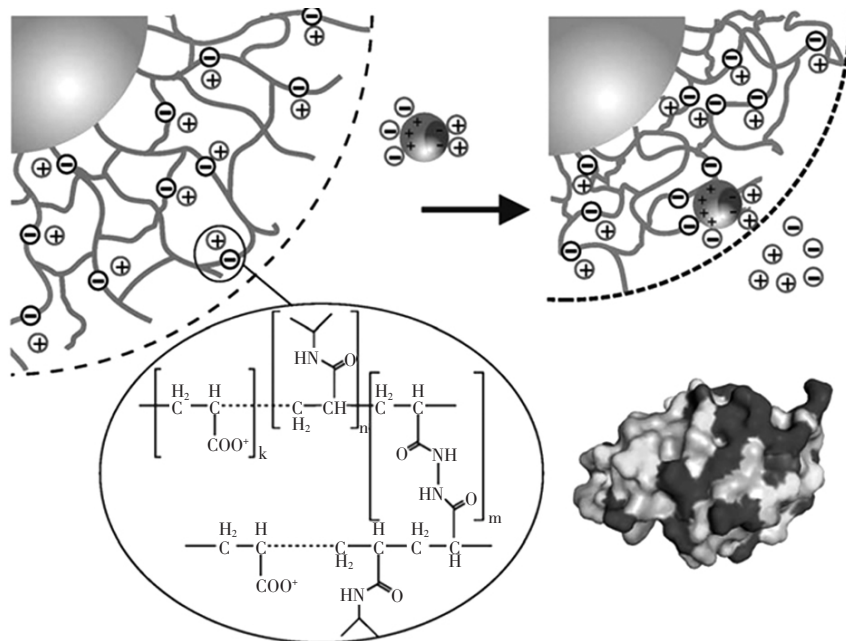


图 2 带正电荷的溶菌酶与带负电荷的核-壳微凝胶之间的吸附作用^[35]

Fig.2 Adsorption between positively charged lysozyme and negatively charged core-shell microgels^[35]

等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)分析表明,溶菌酶在带电凝胶上的吸附是由熵驱动的。盐的添加极大地降低了结合亲和力,这说明静电相互作用在吸附过程中扮演了重要的角色。然而,在高盐浓度下,大量蛋白质与之结合仍未观察到熵的改变,这是由疏水相互作用导致的,通过分析吸附的溶菌酶的酶活性发现活性大约增强为之前的 3.5 倍,表明溶菌酶在进入凝胶时吸收了大约一个质子。核壳微凝胶为溶菌酶提供了“智能”胶体载体,可增强其活性。

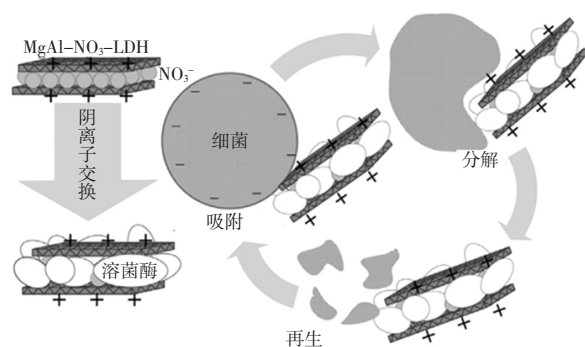
Wu 等^[36-37]基于壳聚糖(chitosan,CS)和三聚磷酸钠(sodium tripolyphosphate,TPP)之间的离子凝胶化方法制备壳聚糖纳米颗粒(chitosan nanoparticles,CS-NPs)。N-H 和 O-H 基团之间的相互作用,通过离子型凝胶化技术将酶结合到 CS-NPs 中制备壳聚糖-溶菌酶纳米凝胶(chitosan-lysozyme nanoparticles,CS-Lys-NPs),纳米凝胶尺寸较小并且带正电荷,能增强对细菌的抗菌活性。CS-NPs 和 CS-Lys-NPs 可以显著抑制大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的生长。与 CS-NPs 相比,CS-Lys-NPs 在抑制大肠杆菌或枯草芽孢杆菌方面更有效。CS-Lys-NPs 可广泛应用于食品工业,以直接添加或掺入包装的形式进行其他应用。Wu 等还发现钙

离子(Ca^{2+})浓度的增加有利于减缓溶菌酶与壳聚糖(CS)/海藻酸钠(sodium alginate,SA)复合物(CS-SA-Ps)中溶菌酶的释放速率。

Uddin 等^[38]发现与未修饰的纤维素纳米纤丝(celulose nanofibrils,CNF)和通过 TEMPO 介导的氧化(TO-CNF)制备的阴离子 CNF 相比,用阳离子 CNF 制备的载有溶菌酶或银纳米颗粒(AgNP)的气凝胶显示出更好的抗菌活性。

Yang 等^[39]通过在层状双金属氢氧化物(layered double hydroxide,LDH)中插入 Lyz 制备溶菌酶层状双氢氧化物纳米复合物(Lyz-LDHs)。Lyz-LDHs 对金黄色葡萄球菌显示出优异的杀菌效果。Lyz-LDHs 的抗菌性能受 Lyz/LDH 比率和 pH 值的影响。这种复合物的杀菌原理是 Lyz-LDHs 通过 LDH 将细菌吸附到其表面,然后通过固定化的 Lyz 杀死它们,见图 3。这种新材料整合了 Lyz 的杀菌能力和 LDH 的吸附能力。此外,Lyz-LDHs 的抗菌能力是持久的,并且不受吸附容量的限制。

纳米凝胶作为溶菌酶的载体极大地提高了溶菌酶的活性,主要是因为纳米凝胶尺寸较小,其所带的正电荷提高了抗菌活性,纳米结构决定了这种材料具有极强的吸附能力,少量的纳米凝胶就能固定大量的

图3 Lyz-LDHs 复合物的灭菌机理^[39]Fig.3 Disinfection mechanism of Lyz-LDHs composites^[39]

溶菌酶,效率极高。同时,纳米凝胶本身的固有特性决定了它能广泛应用在多种形态的食品原料中,在制药工业中的应用也有很大的潜力。

基于球状蛋白和亲水性多糖具有核壳结构的原理组装制备的溶菌酶-葡聚糖纳米凝胶。在很宽的 pH 值范围和高离子强度下都不会发生二次聚集或解离,性质稳定,在 4℃可储存半年以上。以布洛芬为模型药物,用溶菌酶-葡聚糖纳米凝胶对其进行包埋,在不同 pH 值下加入 NaCl,随着 pH 值的增加,对布洛芬的包埋量逐渐降低,研究发现该纳米凝胶适合于疏水性药物的包埋^[40]。

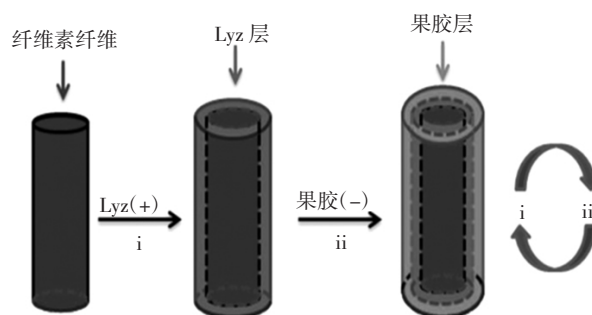
4.2 纳米纤维

Park 等^[41]通过静电纺丝法由混合的壳聚糖/聚乙烯醇(poly vinyl alcohol,PVA)溶液制备直径为 150 nm~200 nm 的壳聚糖(CS)纳米纤维。通过交联酶聚集体(cross-linked enzyme aggregates,CLEAs)将鸡蛋白溶菌酶(Lyz)固定在电纺 CS 纳米纤维上,并用于有效和连续的抗菌应用。在长达 80 d 的室温储存后固定化的溶菌酶-CLEAs 仍保留了其初始活性的 75.4%以上,而游离溶菌酶在相同条件下失去了所有活性。且在连续使用 100 次后保留了超过 76%的活性。溶菌酶-CLEAs 固定的 CS 纳米纤维连续使用 10 次后对 4 种致病细菌显示出 82.4%、79.8%、83.4%和 84.1%的抑菌率,这些优良的特性表明这种纤维可作为一种高效可连续使用的抗菌材料。

以溶菌酶为模型蛋白,聚乳酸为材料,使用静电纺丝法制备了载有溶菌酶的聚乳酸纤维,溶菌酶作为芯层被包裹在聚合物纤维里面。该结构可有效抑制突释,并且在释放过程中能保护溶菌酶的完整结构和生物学活性。根据不同目的制备不同包裹量的复合纤维,可控制缓释,加快了皮肤创面的修复进程,成功应用于糖尿病和皮肤溃疡的治疗^[42]。

通过逐层自组装技术(LBL)将带正电荷的溶菌酶

(Lyz)和带负电荷的果胶交替沉积附着在纤维素纳米纤维垫的表面上,见图 4。可得到热性能更优的改性纤维垫。抑菌试验结果表明 Lyz/果胶双层涂覆的纳米纤维垫对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用有明显的增强^[43]。

图4 纳米纤维垫上的 Lyz/果胶逐层自组装过程^[43]Fig.4 Schematic of Lyz/pectin LBL modification process on nanofibrous mats^[43]

纳米技术在抗菌材料中的应用在近年来逐渐为人所知,但大规模地商用受限于成本,传统保鲜膜与其相比工业化程度极高,制作工艺十分成熟,原材料价格低廉,成本远低于新型纳米抗菌材料。尽早走出实验室,工业化批量生产能大幅度降低纳米抗菌材料的生产成本。完善纳米抗菌材料的生产工艺,降低成本是后续研究的大趋势。

5 结论与展望

溶菌酶拥有独特的生物学特性,在食品医药等领域有着巨大的应用价值和开发前景。物理、化学还有生物改性等能改善溶菌酶活性,溶菌酶与蛋白质多糖等生物高分子以及纳米材料的结合大大地拓展了溶菌酶的抗菌谱,突破其自身存在的局限性,G-菌表面存在的肽聚糖使得溶菌酶对其杀伤性有明显的减弱。通过制备溶菌酶高分子复合材料获得抗菌包装和可控释抗菌薄膜,对溶菌酶进行控释,实现持久高效的抗菌。与纳米材料结合提高了溶菌酶的抗菌效率和时间,有利于在食品领域开发安全高效的新型材料。与多糖的交联作用明显改善了溶菌酶的乳化性、起泡性以及热稳定性,对常见病原微生物的杀伤效果也有显著的提升。天然抗菌蛋白溶菌酶在代替防腐剂方面有极大的前景,对其生物活性的探索有很大的意义。这些研究能为溶菌酶的深入探索提供理论依据和有效的方法途径。

参考文献:

- [1] L-A T, Smith D, Schaschke C J. High pressure processing effects on

- the molecular structure of ovalbumin, lysozyme and β -lactoglobulin[J]. Food Research International, 1999, 32(32): 101–106
- [2] Ward Keeran, Cortés Juan Guillermo Cediel, Stuckey David. Alginate as a support ligand for enhanced colloidal liquid aphron immobilization of proteins and drug delivery[J]. Biotechnology and bioengineering, 2019, 116(12): 3168–3178
- [3] Xueyu Dou, Qian Wang, Zhaoling Li, et al. Seaweed-Derived Electrospun Nanofibrous Membranes for Ultrahigh Protein Adsorption[J]. Advanced Functional Materials, 2019, 29(46). DOI:10.1002/adfm.201905610
- [4] Nathalie Almeida Lopes, Cristian Mauricio Barreto Pinilla, Adriano Brandelli. Antimicrobial activity of lysozyme–nisin co-encapsulated in liposomes coated with polysaccharides[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 93: 1–9
- [5] Zhe W, Hu S, Gao Y, et al. Effect of collagen–lysozyme coating on fresh–salmon fillets preservation[J]. LWT – Food Science and Technology, 2017, 75: 59–64
- [6] Kaewprachu P, Osako K, Benjakul S, et al. Quality attributes of minced pork wrapped with catechin–lysozyme incorporated gelatin film[J]. Food Packaging & Shelf Life, 2015(3): 88–96
- [7] Saroat R, Phunsiri S, Damrongpol K, et al. Mechanical, physico-chemical, and antimicrobial properties of gelatin–based film incorporated with catechin–lysozyme[J]. Chemistry Central Journal, 2012, 6(1): 131–131
- [8] Yuceer M, Caner C. Antimicrobial Lysozyme–Chitosan Coatings Affect Functional Properties and Shelf Life of Chicken Eggs during Storage[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 94(1): 153–162
- [9] 席丽娟. N-琥珀酰壳聚糖固载溶菌酶抑菌膜的制备、性能及应用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017
- [10] Liburdi K, Benucci I, Palumbo F, et al. Lysozyme immobilized on chitosan beads: Kinetic characterization and antimicrobial activity in white wines[J]. Food Control, 2016, 63: 46–52
- [11] Cappannella E, Benucci I, Lombardelli C, et al. Immobilized lysozyme for the continuous lysis of lactic bacteria in wine: Bench-scale fluidized-bed reactor study[J]. Food Chemistry, 2016, 210: 49–55
- [12] Bayarri M, Oulahal N, Degraeve P, et al. Properties of lysozyme/low methoxyl (LM) pectin complexes for antimicrobial edible food packaging[J]. Journal of Food Engineering, 2014, 131(2): 18–25
- [13] 孙浩, 石玉刚, 朱陈敏, 等. 溶菌酶的修饰、功能特性及其在食品保鲜中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(21): 334–342
- [14] Nakamura S, Kato A, Kobayashi K. Bifunctional lysozyme–galactomannan conjugate having excellent emulsifying properties and bactericidal effect[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(5): 735–739
- [15] Hamdani A M, Wani I A, Bhat N A, et al. Effect of guar gum conjugation on functional, antioxidant and antimicrobial activity of egg white lysozyme[J]. Food Chemistry, 2017, 240: 1201–1209
- [16] Hashemi M M, Aminlari M, Forouzan M M, et al. Production and Application of Lysozyme–Gum Arabic Conjugate in Mayonnaise as a Natural Preservative and Emulsifier[J]. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2018, 68(1): 33–43
- [17] Hashemi M M, Aminlari M, Moosavinasab M. Preparation of and studies on the functional properties and bactericidal activity of the lysozyme–xanthan gum conjugate[J]. LWT–Food Science and Technology, 2014, 57(2): 594–602
- [18] Koshani R, Aminlari M, Niakosari M, et al. Production and properties of tragacanthin–conjugated lysozyme as a new multifunctional biopolymer[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 47(Complete): 69–78
- [19] Seyhun G, Ahmet Y, Sacidealsoy A. Development of cellulose acetate based antimicrobial food packaging materials for controlled release of lysozyme[J]. Journal of Food Engineering, 2009, 90(4): 453–462
- [20] Huang W, Xu H, Xue Y, et al. Layer-by-layer immobilization of lysozyme–chitosan–organic rectorite composites on electrospun nanofibrous mats for pork preservation[J]. Food Research International, 2012, 48(2): 784–791
- [21] Barbiroli A, Bonomi F, Capretti G, et al. Antimicrobial activity of lysozyme and lactoferrin incorporated in cellulose–based food packaging[J]. Food Control, 2010, 21(11): 387–392
- [22] 邢易, 魏利娜, 赵之平, 等. 多巴胺改性聚四氟乙烯膜及表面固载溶菌酶[J]. 高分子材料科学与工程, 2016, 32(11): 118–124
- [23] Corradini C, Alfieri I, Cavazza A, et al. Antimicrobial films containing lysozyme for active packaging obtained by sol–gel technique[J]. Journal of Food Engineering, 2013, 119(3): 580–587
- [24] Ozer B B P, Uz M, Oymaci P, et al. Development of a novel strategy for controlled release of lysozyme from whey protein isolate based active food packaging films[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 61(3): 877–886
- [25] Arcan I, Yemenicioğlu A. Development of flexible zein–wax composite and zein–fatty acid blend films for controlled release of lysozyme[J]. Food Research International, 2013, 51(1): 208–216
- [26] Hanušová K, Vápenka L, Dobiáš J, et al. Development of antimicrobial packaging materials with immobilized glucose oxidase and lysozyme[J]. Central European Journal of Chemistry, 2013, 11(7): 1066–1078
- [27] Kriegl C, Arecchi A, Arrecchi A, et al. Fabrication, Functionalization, and Application of Electrospun Biopolymer Nanofibers[J]. Critical reviews in food science and nutrition, 2008, 48(8): 775–797
- [28] Pakravan M, Heuzey M C, Ajji A. Core–Shell Structured PEO–Chitosan Nanofibers by Coaxial Electrospinning[J]. BIOMACROMOLECULES, 2012, 13(2): 412–421
- [29] Bhardwaj N, Kundu S C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique[J]. Biotech Adv, 2010, 28(3): 325–347
- [30] Frenot A, Chronakis I S. Polymer Nanofibers Assembled by Electrospinning[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2003, 8(1): 64–75
- [31] Yan E, Fan Y, Sun Z, et al. Biocompatible core–shell electrospun nanofibers as potential application for chemotherapy against ovary cancer[J]. Materials Science and Engineering: C, 2014, 41: 217–223

- [32] Chronakis I S. Novel nanocomposites and nanoceramics based on polymer nanofibers using electrospinning process—A review[J]. Journal of Materials Processing Technology, 2005, 167(2/3): 283–293
- [33] Anna Z K, Antoine R, Lukasz B, et al. Chitosan and Cystatin/Lysozyme Preparation as Protective Edible Films Components[J]. International Journal of Polymer Science, 2015, 2015: 1–10
- [34] 孙俊. 功能性磁性纳米颗粒的制备及其在食品体系中的应用研究[D]. 无锡:江南大学, 2012
- [35] Welsch N, Becker A L, Dzubiella J, et al. Core-shell microgels as “smart” carriers for enzymes[J]. Soft Matter, 2012, 8(5): 1428–1436
- [36] Wu T, Wu C, Fu S, et al. Integration of lysozyme into chitosan nanoparticles for improving antibacterial activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 155: 192–200
- [37] Wu T, Yuan L, Ni S, et al. Preparation and characterization of calcium alginate-chitosan complexes loaded with lysozyme[J]. Journal of Food Engineering, 2018, 233: 109–116
- [38] Uddin K M A, Orelma H, Mohammadi P, et al. Retention of lysozyme activity by physical immobilization in nanocellulose aerogels and antibacterial effects[J]. Cellulose, 2017, 24(7): 2837–2848
- [39] Yang Q Z, Chang Y Y, Zhao H Z. Preparation and antibacterial activity of lysozyme and layered double hydroxide nanocomposites[J]. Water Research, 2013, 47(17): 6712–6718
- [40] 基于球状蛋白和葡聚糖自组装制备具有核壳结构的纳米凝胶及其作为药物载体的初步研究[D]. 上海:复旦大学, 2008
- [41] Park J M, Kim M, Park H S, et al. Immobilization of lysozyme-CLEA onto electrospun chitosan nanofiber for effective antibacterial applications[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 54(1): 37–43
- [42] 杨晔. 芯壳结构电纺纤维携带生物活性大分子的研究[D]. 成都:西南交通大学, 2010
- [43] Zhang T, Zhou P, Zhan Y, et al. Pectin/lysozyme bilayers layer-by-layer deposited cellulose nanofibrous mats for antibacterial application[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 117: 687–693

收稿日期:2019-09-10

欢迎订阅 2021 年《食品研究与开发》

《食品研究与开发》是由天津市食品研究所有限公司和天津市食品工业生产力促进中心主办,国内外公开发行的食品专业科技期刊,1980年创刊,半月刊,采用国际流行开本大16开。其专业突出,内容丰富,印刷精美,是一本既有基础理论研究,又包括实用技术的刊物。本刊已被“万方数据库”、“中文科技期刊数据库”、《乌利希期刊指南》、美国《化学文摘》、英国国际农业与生物科学研究中心(CABI)、英国《食品科技文摘》(FSTA)等知名媒体收录,并被列入“中文核心期刊”、“中国科技核心期刊”、RCCSE中国核心学术期刊(A)。主要栏目有:基础研究、应用技术、检测分析、生物工程、专题论述、食品机械等。

本刊国内统一刊号 CN 12-1231/TS;国际刊号 ISSN 1005-6521;邮发代号:6-197。全国各地邮局及本编辑部均可订阅。从本编辑部订阅全年刊物享八折优惠。2021年定价:30元/册,全年720元。

本编辑部常年办理邮购,订阅办法如下:

(1) 邮局汇款。地址:天津市静海县静海经济开发区南区科技路9号;收款人:《食品研究与开发》编辑部;邮政编码:301600。

(2) 银行汇款。开户银行:工商银行静海支行,行号:102110000863。

账号:0302095119300204171;单位:天津市食品研究所有限公司。

《食品研究与开发》编辑部

www.tjfrad.com.cn

E-mail: tjfood@vip.163.com

电话(传真): 022-59525671