

食品加工、贮藏对乳杆菌源抗菌肽抑菌活性的影响及安全性评价

杜旭婷, 岳子尧, 董晶, 李恋, 满都拉, 孙子羽, 陈忠军*

(内蒙古农业大学食品科学与工程学院 呼和浩特 010018)

摘要 为明确乳杆菌源抗菌肽粗提粉在食品加工、贮藏过程中的应用,先测定其抑菌谱,然后以白假丝酵母菌为指示菌,从最低抑菌浓度(MIC)、温度、pH、盐浓度、反复冻融以及贮藏时间等方面对粗提粉进行相对抑菌活性评估,然后进行安全性评价。结果表明,乳杆菌源抗菌肽粗提粉具有广谱抑菌性;其热稳定性良好,121℃处理 20 min 仍可保持 79.68%的相对抑菌活性;在 pH 2~6 处理 4 h 后,可保持 90%以上的相对抑菌活性,pH 10~12 处理 4 h 后,几乎完全失活;盐的质量浓度达到 0.8 mg/mL 时,相对抑菌活性显著降低($P<0.05$);在不同温度、不同贮藏时间,相对抑菌活性无显著变化($P>0.05$);经-20℃反复冻融 5 次后的相对抑菌活性同样无显著性差异($P>0.05$)。安全性评价证实粗提粉属无毒、安全级别。结论:乳杆菌源抗菌肽粗提粉稳定性好,适用范围广,可作为生物防腐剂应用于食品领域。

关键词 乳杆菌; 抗菌肽粉; 抑菌活性; 安全性评价

文章编号 1009-7848(2024)01-0110-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.01.012

食品在采摘、加工、运输以及贮藏的过程中会发生腐败变质,不仅造成经济损失,还会危害消费者健康^[1]。引起食品腐败的最主要原因是微生物的污染,除使用盐渍、糖渍等传统方法外,在食品工业中主要使用食品防腐剂来控制腐败微生物的生长繁殖,延长加工食品的货架期^[2]。化学防腐剂成本低廉,然而其中某些化学物质的大量摄入会对人类健康产生负面影响^[3],即使其添加量被控制在对人体无毒的区间,在某些食品中仍无法完全抑制腐败菌的生长^[4]。因此,可以替代化学防腐剂且更加安全的天然防腐剂受到广泛关注。乳酸菌抗菌肽是乳酸菌分泌的对腐败菌或病原菌具有抑制活性的多肽,因生物安全性及抑菌活性而在食品加工、保藏、饲料生产及医药领域有较成功的应用^[5]。在食品加工过程中,酸碱度会影响抗菌肽抑菌活性,如乳酸链球菌素 Nisin 适用于酸性环境,而对中性以及碱性环境不耐受^[6]。抗菌肽 Brevilactin 经-20℃反复冻融 6 次后,其抑菌活性略微下降^[7]。乳酸链球菌素(乳酸菌生产)和聚赖氨酸(链霉菌生产)是我国目前批准,并应用于乳品加工的两种微生物代谢物,研究新型乳酸菌抗菌肽

在我国食品行业有着广阔前景。前期研究发现乳杆菌 ALAC-4 所产抑菌物质对细菌和真菌均具有良好的抑菌活性。本试验将其代谢产物粗提液制得粗提粉,研究食品加工、贮藏因素对其抑菌活性的影响,分析其最适使用条件及范围。根据《食品安全国家标准急性经口毒性试验》(GB 15193.3-2014)对该粗提粉的安全性进行评价,为其作为生物防腐剂应用于食品行业奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

YEPD 液体培养基:大豆蛋白胨 20 g/mL,酵母提取粉 10 g/mL,葡萄糖 20 g/mL,pH 6.0,115℃ 20 min 灭菌;YEPD 固体培养基:在 YEPD 液体培养基的基础上添加琼脂粉 15 g/mL;水琼脂培养基:琼脂粉 15 g/mL,121℃ 20 min 灭菌。

乳杆菌 ALAC-4 分离自内蒙传统发酵食品;白假丝酵母(*Candida albicans*,CICC32819)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、青霉(*Penicillium*)、娄地青霉(*Penicillium roqueforti*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、毛霉(*Mucor*)、寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)、白地霉(*Geotrichum*)、桔青霉(*Penicillium citrinum*)、粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)、克柔假丝酵母(*Candida krusei*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、汉逊德巴利酵母(*Debaryomyces hansenii*)、鲁氏酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*)、

收稿日期: 2023-01-27

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(2020ZD13);
内蒙古自治区科技计划项目(2021GG0083)

第一作者: 杜旭婷,女,硕士生

通信作者: 陈忠军 E-mail: nmndchen@126.com

粉状毕赤氏酵母(*Pichia farinosa*)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)均来自于中国工业微生物菌种保藏管理中心。

乳清粉、酪蛋白水解酶、大豆蛋白胨、酵母提取粉、葡萄糖、琼脂、NaCl,广东环凯微生物科技有限公司。

ELx808 酶标仪,美国伯腾有限公司;LDZX-75KBS 型立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;SW-CJ-2FD 型垂直净化工作台,苏州博莱尔净化设备有限公司;DHP-9162B 型电热恒温培养箱、HWS012 型电热恒温水浴锅,上海一恒科学仪器有限公司;FA2104N 型电子天平,上海菁海仪器有限公司;BCD-249CF 型美菱冰箱,合肥美菱股份有限公司;PB-10 型 pH 计,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;KDC-140HR 型高速冷冻离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;IKA®RV10 digital 型旋转蒸发仪,广州仪科实验室技术有限公司;真空冷冻干燥机,河南兄弟有限公司。

实验动物:昆明种小白鼠(3~8周,22只)、基础饲料及笼底垫料均由北京斯贝福实验动物有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 乳杆菌源抗菌肽粗提粉制备 乳杆菌活化至3代,备用。取乳清粉100g溶于1L 90℃蒸馏水中,调节pH 4.5,90℃水浴30min,经脱脂棉和纱布过滤后,调节pH 6.5,煮沸后抽滤,再加等量蒸馏水,以及酪蛋白水解酶5g/L,葡萄糖1g/L,酵母粉2g/L,121℃ 20min 灭菌,待冷却后接种乳杆菌发酵,将发酵液离心浓缩并真空冷冻干燥,最后研磨成粉,备用。

1.2.2 抑菌谱的测定 选取食品中常见的致病菌和腐败菌作为指示菌,测定其抑菌活性,从而确定抑菌谱。

1.2.3 相对抑菌活性的测定 指示菌菌液制备:从菌种保藏斜面用无菌接种环刮取1环白假丝酵

母菌接种至 YEPD 液体培养基中,活化1代(30℃,36h),再接种到 YEPD 液体培养基,传2代培养(30℃,36h),备用^[8]。

双层平板法测定相对抑菌活性^[9]:水琼脂培养基倒平板,待板凝固后使用无菌镊子将无菌牛津杯置于水琼脂上;无菌生理盐水将指示菌梯度稀释至 10^3 CFU/mL;1 mL 指示菌液加入到25 mL YEPD 琼脂培养基,摇匀后倒入平皿内,待凝固后取出牛津杯;于孔内加入200 μ L 粗提粉溶液,30℃培养36h后,量取抑菌圈直径。相对抑菌活性按公式(1)计算:

相对抑菌活性(%) = 试验组平均抑菌圈直径(mm)/对照组平均抑菌圈直径(mm)×100 (1)

1.2.4 最低抑菌浓度测定 参考李钰芳等^[10]的方法并稍作修改,测定粗提粉的最小抑菌质量浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)。取对数期的指示菌菌体,用无菌生理盐水洗涤菌体3次后,制备成菌悬液(菌液浓度为 10^3 CFU/mL),加入96孔板内。用二倍稀释法将粗提粉稀释后加入菌悬液中;设置空白组为等量无菌水代替菌悬液,其余条件相同;设置对照组为等量无菌水代替粗提粉溶液。将96孔板置于30℃恒温培养箱孵育36h,测定试验组与空白组的 OD_{600nm} 差值,以粗提粉质量浓度为横坐标, OD_{600nm} 差值为纵坐标绘制曲线,拐点即为MIC。

1.2.5 食品贮藏过程中不同因素对抗菌肽粉抑菌活性的影响

1.2.5.1 贮藏温度与贮藏时间对抑菌活性的影响

将粗提粉分别在-80,-20,4℃条件下,处理1周,15d,1个月及3个月,恢复至室温(25℃),配成终质量浓度为MIC的粗提粉溶液,以未处理的样品作为对照(相对抑菌活性为100%),然后用双层平板法测定相对抑菌活性,研究不同贮藏温度与贮藏时间对粗提粉抑菌活性的影响。重复处理3次。

1.2.5.2 反复冻融对抑菌活性的影响 将粗提粉反复冻融(-20℃冻结,常温解冻,反复冻融5次),恢复至室温,配成终质量浓度为MIC的粗提粉溶液,以未处理的样品作为对照(相对抑菌活性为100%),然后用双层平板法测定相对抑菌活性,研究反复冻融次数对粗提粉抑菌活性的影响。重复

处理3次。

1.2.6 食品加工过程中不同因素对抗菌肽粉抑菌活性的影响

1.2.6.1 高温处理对抑菌活性的影响 取终质量浓度为MIC的粗提粉溶液,分别在40,60,80,100℃下水浴30 min,121℃高温处理20 min,然后冷却至室温,以未处理的样品作为对照(相对抑菌活性为100%),采用双层平板法测定相对抑菌活性,研究不同高温对粗提粉抑菌活性的影响。重复处理3次。

1.2.6.2 pH处理对抑菌活性的影响 取终质量浓度为MIC的粗提粉溶液,分别用HCl和NaOH调节溶液pH值至2.0,4.0,6.0,8.0,10.0,12.0,室温处理4 h,调回pH值至中性(6.5~7.5),以未处理的样品作为对照(相对抑菌活性为100%),然后用双层平板法测定相对抑菌活性,研究不同pH值对粗提粉抑菌活性的影响。重复处理3次。

1.2.6.3 盐的质量浓度对抑菌活性的影响 配制质量浓度分别为0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mg/mL的NaCl溶液,加入粗提粉,使终质量浓度为MIC,室温处理4 h后,以未经NaCl处理的样品作为对照(相对抑菌活性为100%),然后用双层平板法测定相对抑菌活性,研究不同盐的质量浓度对粗提粉抑菌活性的影响。重复处理3次。

1.2.7 安全性评价 采用限量法进行小鼠急性经口毒性试验:选取22只健康昆明种小白鼠,雌雄各半(雌性为未交配过、未妊娠过的),随机挑选2只(1雌1雄)作为对照,体质量为(20±2)g(同性别个体体质量不超过平均体质量的20%),预饲3 d后进行正式实验。灌胃前禁食4 h,粗提粉溶液浓度为1×MIC,灌胃体积为20 mL/kg体质量。灌喂后禁食2 h,自由饮水。每天定时饲喂,连续观察7 d并记录小鼠的一般情况、动作行为和死亡状况。实验结束后解剖,摘取各组小鼠的心、肝、脾、肺、肾,经4%多聚甲醛固定后,再脱水、浸蜡、包埋、切片,做HE染色。在显微镜下观察分析各脏器组织的病理变化,并测定其心、肝、脾、肺、肾的脏器指数。脏器指数测定按公式(2)计算:

$$\text{脏器指数}(\%) = \frac{\text{脏器质量}(\text{g})}{\text{体质量}(\text{g})} \times 100 \quad (2)$$

1.2.8 试验数据处理 试验结果以“平均值±标准偏差($\bar{x} \pm s, n=3$)”表示,用Origin 2019绘制统计

图,采用SPSS 25.0单因素ANOVA检验进行组间均数差异多重比较,两两比较方差齐性时采用最小显著性差异法,非齐性时使用塔姆黑尼T2方法,显著性水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 抑菌谱

乳杆菌源抗菌肽的抑菌谱如表1所示,可以发现它仅对白地霉、克柔假丝酵母、酿酒酵母、汉逊德巴利酵母和粉状毕赤酵母5株菌无抑菌性,对黑曲霉、毛霉、粘红酵母、白假丝酵母和8株表中细菌具有强抑菌性,其中对白假丝酵母的抑制

表1 乳杆菌源抗菌肽抑菌谱

Table 1 Antimicrobial spectrum of *Lactobacillus*-derived antimicrobial peptide

分类	指示菌	抑菌性	
霉菌	黄曲霉(<i>Aspergillus flavus</i>)	++	
	青霉(<i>Penicillium</i>)	++	
	萎地青霉(<i>Penicillium roqueforti</i>)	+	
	黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)	+++	
	毛霉(<i>Mucor</i>)	+++	
	寄生曲霉(<i>Aspergillus parasiticus</i>)	+	
	白地霉(<i>Geotrichum</i>)	-	
	桔青霉(<i>Penicillium citrinum</i>)	+	
	酵母	粘红酵母(<i>Rhodotorula glutinis</i>)	+++
		白假丝酵母(<i>Candida albicans</i>)	++++
克柔假丝酵母(<i>Candida krusei</i>)		-	
酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)		-	
汉逊德巴利酵母(<i>Debaryomyces hansenii</i>)		-	
鲁氏酵母(<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>)		+	
粉状毕赤氏酵母(<i>Pichia farinosa</i>)		-	
细菌	肠炎沙门氏菌(<i>Salmonella enteritidis</i>)	+++	
	鼠伤寒沙门氏菌(<i>Salmonella typhimurium</i>)	+++	
	金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	+++	
	大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	+++	
	荧光假单胞菌(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	+++	
	恶臭假单胞菌(<i>Pseudomonas putida</i>)	+++	
	蜡样芽胞杆菌(<i>Bacillus cereus</i>)	+++	
	单核细胞增生李斯特菌(<i>Listeria monocytogenes</i>)	+++	

注:8~10 mm 弱抑菌性(+);10~15 mm 较强抑菌性(++);15~20 mm 强抑菌性(+++);>20 mm 极强抑菌性(++++);无抑菌性(-)。

作用更为突出。而枯草芽胞杆菌 D9^[11]所产抗菌肽只对金黄色葡萄球菌、创伤弧菌、哈维氏弧菌有抑制作用,且抑菌效果不强。由此可见,乳杆菌源抗菌肽对于引起食品腐败的细菌和酵母、霉菌都有较强的抑菌效果,具有广谱的抑菌性。尤其对白假丝酵母有更加显著的抑菌效果。

2.2 最低抑菌质量浓度

如图 1 所示,当粗提粉质量浓度增加时,对应 OD_{600nm} 呈降低趋势,当粗提粉质量浓度增加到 1 g/mL 时,OD_{600nm} 几乎无变化,白假丝酵母菌也无法正常生长,因此粗提粉对白假丝酵母菌的 MIC 为 1 g/mL。

2.3 食品贮藏过程中各因素对抑菌活性的影响

2.3.1 贮藏温度和贮藏时间对抑菌活性的影响

通过模拟市场中的保藏温度条件,即冷藏环境(4℃)、慢冻环境(-20℃)及速冻环境(-80℃),研究不同贮藏温度和贮藏时间对粗提粉抑菌特性的影响。根据图 2 可知,在低温条件下,长期贮藏粗提粉相对抑菌活性均无显著变化($P>0.05$),当贮藏时间达到 90 d,4,-20,-80℃的相对抑菌活性为(93.27±2.66)%,(94.45±0.53)%,(90.18±5.30)%,表明乳杆菌源抗菌肽粗提粉具有良好的贮藏稳定性,能够在极端低温条件下,长期抑制病原菌及腐败菌的生长。这一结果可能由于抗菌肽结构简单,在冷藏、冷冻时肽键以及氢键不易解开,当温度缓慢恢复后,抗菌肽的抑菌活力也会恢复。Yi 等^[12]也发现乳杆菌源细菌素 BMA 在 4℃下贮藏 3 个月,其抑菌活性依然良好。同为乳杆菌源抗菌肽,它们都表现出稳定的耐贮藏性,这为乳杆菌源抗菌肽粗提粉在食品防腐领域中奠定了良好的基础。

2.3.2 反复冻融对抑菌活性的影响 由图 3 可知,粗提粉经 5 次反复冻融处理后,相对抑菌活性与对照组均无显著差异($P>0.05$),在第 5 次冻融后,其相对抑菌活性略有下降至(94.87±7.23)%,表明乳杆菌源抗菌肽粗提粉具有良好的反复冻融稳定性。低温环境可以维持各类食品商品品质,而反复解冻的操作极易造成腐败菌污染,同时抗菌肽的抑菌活性很可能会受反复冻融处理的影响^[13]。瞿青新^[14]研究表明酪蛋白源抗菌肽经-20℃反复冻融,其抑菌活性无明显改变,王美姿等^[15]也与本研究结果相似。

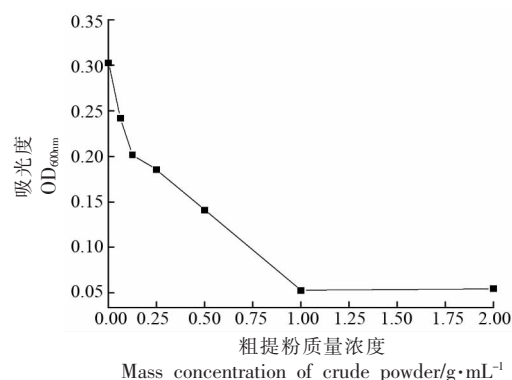


图 1 粗提粉最低抑菌浓度

Fig.1 MIC of crude lift powder

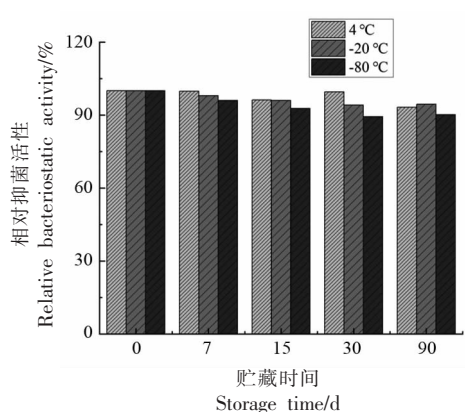
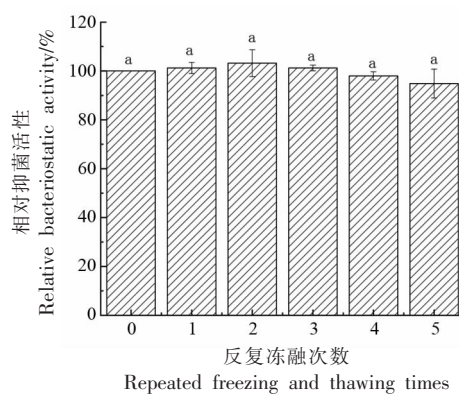


图 2 贮藏温度和贮藏时间对抑菌活性的影响

Fig.2 The effect of storage temperature and storage time on antimicrobial activity



注:相同小写字母表示无显著性差异($P>0.05$)。

图 3 反复冻融对抑菌活性的影响

Fig.3 The effect of freeze-thaw cycle on antimicrobial activity

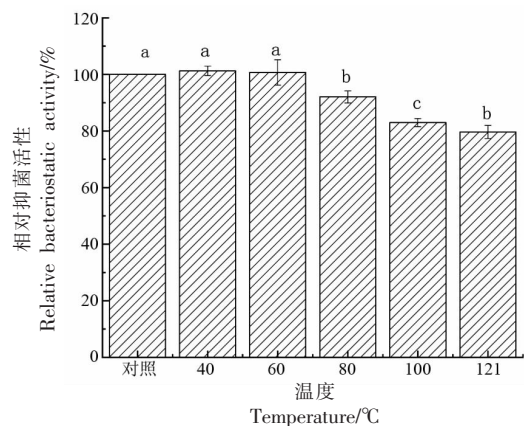
2.4 食品加工过程中不同因素对抗菌肽粉抑菌活性的影响

2.4.1 高温处理对抑菌活性的影响 不同高温处理对粗提粉抑菌活性的影响,如图 4 所示。粗提粉

相对抑菌活性在 40~60 °C 范围内处理 30 min 无显著性差异 ($P>0.05$), 80 °C 处理 30 min 后略有下降, 经 100 °C 处理 30 min, 121 °C 处理 20 min 后, 对白假丝酵母菌的相对抑菌活性仍然能维持在 80% 左右, 表明乳杆菌源抗菌肽粗提粉具备良好的热稳定性。这一结果可能由于抗菌肽分子质量小于 500 u, 二级结构简单, 高温对其结构影响小, 使得极端环境消失后, 抗菌肽会很大程度上恢复其原始结构, 并发挥作用^[16]。这与很多研究结果相似, 辣椒籽抗菌肽经 25~100 °C 及 121 °C 高温处理后, 其残留活性依然能保持 90% 以上^[17], 侧孢短芽孢杆菌 S62-9 发酵所产抗菌肽随着温度的升高, 抑菌活性逐步下降, 然而在 100 °C 处理后, 活性回收率为 80% 左右, 121 °C 处理后活性回收率为 70% 左右, 同样具有良好的抑菌热稳定性^[18]。而朱张洪基^[19]研究的 SDLH 抑菌蛋白在 50~80 °C 时的抑菌活性与常温时的相比显著性降低, 原因可能是该抑菌蛋白分子质量大, 高温处理破坏其空间结构, 从而对抑菌活性产生影响。

2.4.2 pH 处理对抑菌活性的影响 当高 pH 处理后粗提粉相对抑菌活性发生显著性降低, 结果见图 5。当 $\text{pH} \leq 8.0$ 时, 粗提粉的相对抑菌活性无显著变化 ($P>0.05$), 当 $\text{pH} = 8.0$ 时, 粗提粉的相对抑菌活性比对照组降低了 16.53%, 当 $\text{pH} \geq 8.0$ 时, 粗提粉相对抑菌活性显著降低 ($P<0.05$), 几乎丧失抑菌活性, 表明乳杆菌源抗菌肽粗提粉更适用于偏酸性的环境。原因 1 可能是抗菌肽经酸处理后更易溶解; 原因 2 可能是抗菌肽经酸碱处理后的带电状态变化, 进一步影响粗提粉与白假丝酵母菌细胞膜的相互作用^[20]。已经试验批准并应用于食品防腐领域的乳酸链球菌素经低 pH 处理后稳定性良好, 中性处理后活性降低, 并在 $\text{pH} = 8.0$ 及以上处理后基本完全失活^[21], 这与本研究的乳杆菌源抗菌肽粗提粉具有相似性, 其原因可能是两种物质皆源于乳酸菌, 而这种特性会限制其在中性和碱性条件下的应用。

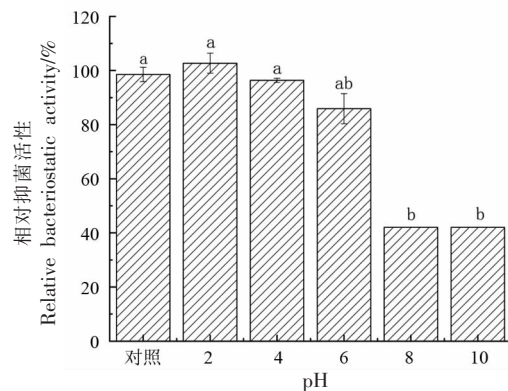
2.4.3 盐的质量浓度对抑菌活性的影响 不同盐质量浓度对粗提粉相对抑菌活性的影响, 如图 6 所示。结果表明, 当盐质量浓度 $\leq 0.6 \text{ mg/mL}$ 时, 粗提粉的相对抑菌活性无显著变化 ($P>0.05$), 当盐质量浓度过高时, 其相对抑菌活性有大幅度下降,



注: 不同小写字母表示具有显著性差异 ($P<0.05$)。

图 4 高温对抑菌活性的影响

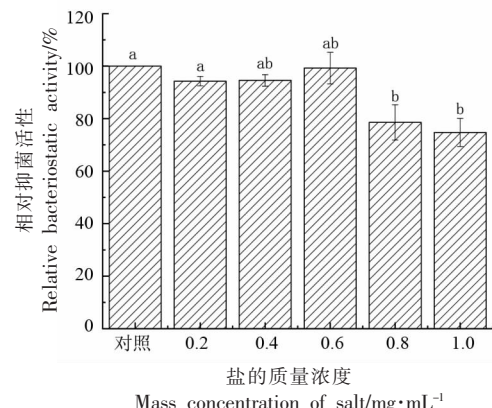
Fig.4 The effect of high temperature on antimicrobial activity



注: 不同小写字母表示具有显著性差异 ($P<0.05$)。

图 5 pH 值对抑菌活性的影响

Fig.5 The effect of pH value on antimicrobial activity



注: 不同小写字母表示具有显著性差异 ($P<0.05$)。

图 6 盐浓度对抑菌活性的影响

Fig.6 The effect of salinity on antimicrobial activity

最低至(74.74±6.50)%,表明乳杆菌源抗菌肽粗提粉对高盐环境的抗性较差。肖怀秋等^[22]所研究的金属抗菌肽 SIF4 在 50~200 mmol/L 盐浓度内,其相对抑菌活性均无显著差异,而刘国荣等^[23]所研究的双歧杆菌细菌素 BB04,在 10~200 mmol/L 的盐浓度范围内,抑菌效果差异显著,不适用于高盐环境。由此可知,不同抗菌肽的高盐环境适应性存

在差异。

2.5 安全性评价

2.5.1 临床症状 对照组和实验组小鼠的一般情况和动作行为的观察记录表明(表 2),整个实验期间对照组和实验组小鼠的采食饮水情况、外观以及动作行为等均无明显异常。也未发现经灌胃粗提粉溶液后,小鼠出现明显的表现中毒现象。

表 2 小鼠生长体征情况
Table 2 Growth signs of mice

组别	初始体质量/g	结束体质量/g	平均增重/g	平均耗料/g	料重比	饮水量	精神状态	皮毛光泽度	反应灵敏度
对照组	20.26 ± 0.10	32.56 ± 3.30	12.30	69.79	5.68:1	正常	正常	正常	正常
实验组	20.14 ± 0.59	32.26 ± 3.39	12.12	72.52	5.98:1	正常	正常	正常	正常

2.5.2 半数致死量及脏器指数情况 由表 3 可以看出,实验过程中对照组和实验组小鼠均未出现死亡情况。则认为粗提粉对动物的经口急性毒性耐受剂量大于 20 g/kg,其 LD₅₀>20 g/kg,根据食品添加剂急性毒性分级标准,该粗提粉属于实际无

毒级。因此,该粗提粉应用于食品添加剂是安全可行的。经灌胃粗提粉溶液后,小鼠的心、肝、脾、肺、肾的脏器指数与对照组相比均差异不显著($P>0.05$),表明在一次性灌胃高剂量粗提粉,即 20 g/kg 对各脏器的形态以及质量无显著影响。

表 3 小鼠存活情况及脏器指标
Table 3 Mice survival and organ indicators

组别	剂量/g·kg ⁻¹	动物数/只	死亡数/只	死亡率/%	心脏指数	肝脏指数	脾脏指数	肺脏指数	肾脏指数
对照组	0	20	0	0	0.64 ± 0.15	6.73 ± 1.23	0.36 ± 0.06	0.76 ± 0.23	1.84 ± 0.44
实验组	20	20	0	0	0.71 ± 0.09	5.85 ± 0.98	0.30 ± 0.08	0.85 ± 0.12	1.57 ± 0.18

2.5.3 脏器及组织病理变化 通过观察实验组小鼠的脏器及组织,发现实验组和对照组间宏观脏器的色泽、形态、质地等均没有差异,无明显病变及坏死,对照组小鼠各脏器组织有完整、清晰的结构;经抗菌肽灌胃后,小鼠各脏器内细菌形态少见,与对照组相比无明显病理变化。由此说明,一次灌服 20 g/kg 的粗提粉不会造成脏器和组织的急性病理现象。

3 结论

抗菌肽抑菌活性的稳定性会制约其在食品防腐领域中的适用范围及潜力,研究新型抗菌肽在面临食品加工、贮藏过程中极端情况下的抑菌稳定性,对其作为食品添加剂开发应用具有重大意义。本研究模拟食品加工过程中,遇到的高温、不

同 pH、高盐环境对具有广谱抑菌性的抗菌肽粗提粉的影响,发现其具有良好的热稳定性,在强碱以及高盐环境下,其相对抑菌活性显著降低($P<0.05$),表明其适用于偏酸、中性以及低盐环境。在食品贮藏期间面临的温度变化、长期保存以及反复冻融的情况下,粗提粉与对照相比其相对抑菌活性均无显著变化($P>0.05$),在长期贮藏达到 3 个月时,3 种低温贮藏温度下的粗提粉相对抑菌活性均能保存 90%以上,表明该粗提粉能够适应长期低温保藏并具有反复冻融的能力。小鼠急性经口毒性实验表明受试物未显示毒性,采用限量法评价其安全性发现,小鼠在灌胃量为 20 g/kg 后表现正常,未出现中毒现象以及死亡情况,根据《食品安全国家标准急性经口毒性试验》初步表明该乳酸菌抗菌肽粗提粉的安全级别属于实际无

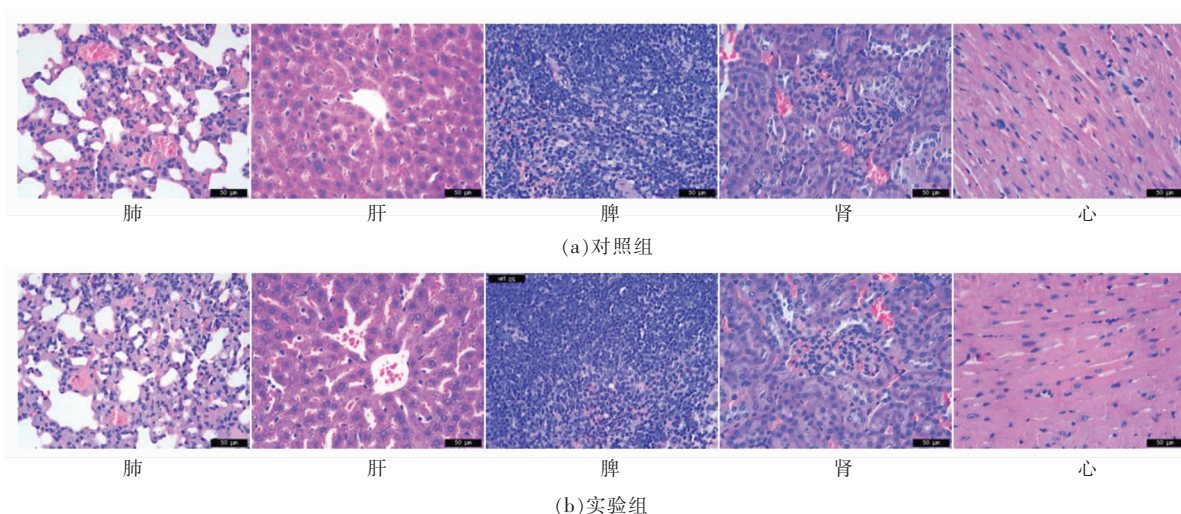


图7 小鼠脏器组织病理切片

Fig.7 Histopathological sections of the mouse organs

毒。以上结果表明乳杆菌源抗菌肽粗提粉在食品加工及贮藏中不同条件下能够保持良好抑菌稳定性,且安全无毒,因此其作为一种新型食品防腐剂具有良好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 周志江. 生物防腐剂及其在食品防腐中的应用[J]. 保鲜与加工, 2015, 15(1): 1-8.
ZHOU Z J. Biological preservatives and their application for food preservation[J]. Storage and Process, 2015, 15(1): 1-8.
- [2] 王丽, 张毓, 陈翠岚. 我国食品防腐剂的应用及发展趋势[J]. 食品安全质量检测学报, 2011, 2(2): 83-87.
WANG L, ZHANG Y, CHEN C L. Application and trend of development on food preservations in China [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2011, 2(2): 83-87.
- [3] JEAN-CLAUDE M, ANA P B M, RAFAEL M C, et al. Consumption of ultra-processed foods and likely impact on human health. Evidence from Canada[J]. Public Health Nutrition, 2012, 16(12): 2240-2248.
- [4] MARCIA L S, JEROME M, FLORENCE V, et al. Antifungal microbial agents for food biopreservation—A review[J]. Microorganisms, 2017, 5(3): 37-43.
- [5] COTTER P D, ROSS R P, HILL C. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? [J]. Nature Reviews. Microbiology, 2013, 11(2): 95-105.
- [6] 李铁军, 李爱云, 张晓峰. 乳酸菌抗菌机理研究进展[J]. 微生物学通报, 2002, 29(5): 81-85.
LI T J, LI A Y, ZHANG X F. Advances in antibacterial mechanism of lactic acid bacteria[J]. Microbiology Bulletin, 2002, 29(5): 81-85.
- [7] SILVA C C G, SILVA S P M, RIBEIRO S C. Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9(12): 594.
- [8] 陈忠军, 李海瑄, 高鹤尘. 乳杆菌产生的抑菌活性物质对酵母细胞膜通透性的影响[J]. 中国乳品工业, 2015, 43(2): 28-31.
CHEN Z J, LI H X, GAO H C. Study on the effect of active substances produced by *Lactobacillus* on permeability of the yeast cell membrane[J]. China Dairy, 2015, 43(2): 28-31.
- [9] 田双娥. 三种不同抑菌圈试验法在牛至油抑菌评价中的应用研究[J]. 香料香精化妆品, 2019(1): 37-41.
TIAN S E. Study on three kinds of inhibition zone tests applied in evaluation of antifungal activity of oregano oil[J]. Flavour Fragrance Cosmetics, 2019(1): 37-41.
- [10] 李钰芳, 杨昆, 顾韦维, 等. 乳源抗菌肽 BCp12 对金黄色葡萄球菌多靶点抑菌机制[J]. 食品科学, 2021, 42(23): 34-41.
LI Y F, YANG K, GU W W, et al. Multi-target

- antibacterial mechanism of milk-derived antimicrobial peptide BCp12 against *Staphylococcus aureus* [J]. Food Science, 2021, 42(23): 34-41.
- [11] 朱晶婷. 副溶血性弧菌拮抗菌的筛选及其拮抗效果研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2019.
- ZHU J T. Screening and antagonism characteristic of antagonistic bacteria against *Vibrio parahaemolyticus* [D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2019.
- [12] YI L, DANG Y, WU J, et al. Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus crustorum* MN047 isolated from koumiss from Xinjiang, China [J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(9): 7002-7015.
- [13] LEE J E, KIM S Y, SHIN S Y. Effect of repeated freezing and thawing on biomarker stability in plasma and serum samples [J]. Osong Public Health and Research Perspectives, 2015, 6(6): 357-362.
- [14] 翟青新. 酪蛋白酶解及其产物的抑菌活性[D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- ZHAI Q X. Antibacterial activity of casein hydrolysates by trypsin [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2005.
- [15] 王美姿, 刘杨柳, 韩盼盼, 等. 外界因素和食品内部环境变化对 Brevilaterin 抗菌特性的影响 [J]. 食品科学技术学报, 2021, 39(1): 78-87.
- WANG M Z, LIU Y L, HAN P P, et al. Effect of external factors and internal environment changes of food on antibacterial properties of Brevilaterin [J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 39(1): 78-87.
- [16] HOU X Y, FENG C Y, LI S S, et al. Mechanism of antimicrobial peptide NP-6 from Sichuan pepper seeds against *E. coli* and effects of different environmental factors on its activity [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(16): 6593-6604.
- [17] 杨叶梅, 刘志云, 曾兵, 等. 辣椒籽抗菌肽的抑菌活性及其稳定性研究 [J]. 动物营养学报, 2019, 31(9): 4322-4330.
- YANG Y M, LIU Z Y, ZENG B, et al. Antimicrobial activity and stability of antimicrobial peptide derived from pepper seeds [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31(9): 4322-4330.
- [18] 杨倩, 于宏伟, 郭润芳, 等. 侧孢短芽孢杆菌 S62-9 产抗菌物质的分离纯化及部分特性的研究 [J]. 河北农业大学学报, 2010, 33(2): 74-78.
- YANG Q, YU H W, GUO R F, et al. Study on purification and partial properties of antimicrobial substance from *Brevibacillus laterosporus* S62-9 [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2010, 33(2): 74-78.
- [19] 朱张洪基. SDLH 抗菌肽在食品防腐作用中的初步探索 [D]. 太原: 山西大学, 2012.
- ZHU Z H J. Probe into the preservative effect on food of SDLH antimicrobial peptides [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2012.
- [20] TANG W T, YUAN H N, ZHANG H, et al. An antimicrobial peptide screened from casein hydrolyzate by *Saccharomyces cerevisiae* cell membrane affinity method [J]. Food Control, 2015, 50: 413-422.
- [21] SAMELIS J, BEDIE G K, SOFOS J N, et al. Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4 C in vacuum packages [J]. LWT-Food Science and Technology, 2005, 38(1): 21-28.
- [22] 肖怀秋, 李玉珍, 林亲录, 等. 食品内外部因素对金属抗菌肽 SIF4 抑菌活性影响及生物相容性分析 [J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(14): 181-187.
- XIAO H Q, LI Y Z, LIN Q L, et al. Effects of food internal and external factors on the antimicrobial activity of metal antimicrobial peptide SIF4 and its biocompatibility [J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(14): 181-187.
- [23] 刘国荣, 宋振芹, 郜亚昆, 等. 食品加工环境因素对双歧杆菌细菌素 BB04 抑菌作用的影响 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(2): 125-129, 137.
- LIU G R, SONG Z Q, GAO Y K, et al. Effect of environmental factors in food processing on the inhibitory activity of bacteriocin BB04 [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(2): 125-129, 137.

Effect of Food Processing and Preservation on Antimicrobial Activity of *Lactobacillus*-Derived Antimicrobial Peptide and Its Safety Evaluation

Du Xuting, Yue Ziyao, Dong Jing, Li Lian, Mandlaa, Sun Ziyu, Chen Zhongjun*

(College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018)

Abstract In order to clarify the application potential and application scope of crude powder in food processing and storage, the antibacterial spectrum was first determined. Using *Candida albicans* as the indicator bacteria, the relative antibacterial activity of crude powder was evaluated from the minimum inhibitory concentration, temperature, pH, salt concentration, repeated freezing and storage time, and finally the safety evaluation was conducted. The results showed that, crude powder of *Lactobacillus*-derived antimicrobial peptide has broad-spectrum antibacterial properties; With its good thermal stability, 121 °C still maintain 79.68% relative antibacterial activity for 20 min; pH 2–6 treatment maintained over 90% of the relative antibacterial activity after 4 h, almost complete inactivation after 4 h of pH 10–12 treatment; When the salt mass concentration reaches 0.8 mg/mL, the relative antibacterial activity was significantly reduced ($P < 0.05$); The relative antibacterial activity had no significant change after storage at different low temperatures for different time ($P > 0.05$); The relative antibacterial activity after repeated freezing and thawing 5 times at -20 °C was also not different ($P > 0.05$); The safety evaluation confirmed that crude powder belongs to the actual non-toxic safety level. In conclusion, it can be seen that the crude powder of *Lactobacillus*-derived antimicrobial peptide has good stability and a wide range of applications, and has broad application prospects as a biological preservative in the food field.

Keywords *Bacillus lactis*; antimicrobial peptide powder; bacteriostatic activity; safety evaluation