

新疆家蚕抗菌肽在番茄汁加工中的应用研究

郑 力, 李友广*

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源与基因工程重点实验室, 新疆 乌鲁木齐

830046)

摘 要: 本文研究了新疆家蚕抗菌肽的耐热性及其对部分微生物的最小抑菌浓度, 和其在不同 pH 值条件下的溶解度及抑菌效果。并在此基础上进行正交试验, 得到将其应用于番茄汁加工中的最佳工艺条件, 抗菌肽的添加可降低番茄汁的杀菌强度, 提高产品品质, 为工业化生产应用提供科学依据。

关键词: 家蚕抗菌肽; 番茄汁; 杀菌强度; 品质

Study on Application of Cecropin-XJ from Xinjiang Silkworm in Tomato Juice Processing

ZHENG Li, LI You-guang*

(Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: The paper made a main research about the heat-resisting characteristic of cecropin-XJ isolated from Xinjiang Silkworm to find its minimum concentration to kill microorganism, and its solubility and effects on restraining microorganism in different pHs. Furthermore, adding it into tomato juice as processing ingredients by orthogonal test to obtain the optimum conditions of processing, the results showed that it enhances the sterilization strength and improves the quality of tomato juice and provides guidance for industrial production.

Key words cecropin-XJ; tomato juice; sterilization strength; quality

中图分类号 TS201.3

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2007)03-0135-05

食品工业常使用化学防腐剂来配合常规的杀菌手段以降低热杀菌强度, 从而减轻热杀菌给产品品质带来的不利影响, 但由于化学防腐剂存在长期毒性等副作用, 和媒体宣传的夸大作用影响, 引起人们对含有化学合成食品添加剂食品的抵制。随着绿色食品工业的兴起, 化学防腐剂将逐渐被限制使用, 一类纯天然的防腐剂——抗菌肽, 如 Nisin 等正在部分地取代传统食品添加剂而被世人接受。抗菌肽是一类具有抗菌作用的多肽, 其分子量小、结构紧密、热稳定性好^[1]。抗菌肽具有强大的抗菌活性, 但它不是细胞毒素^[2], 可以被人体内的酶系降解、消化, 且多数具有酸、热稳定性和低温贮藏稳定性, 使其具有独特的使用特性, 是一类潜力很大的生物防腐剂。由于抗菌肽具有众多优点, 迅速成为生命科学领域的研究热点, 对昆虫抗菌肽的研究具有重要理论意义和实际应用价值^[3]。由于其来源安全可靠, 无毒副作用并可在一定食品范围内起到抑制微生物的生长繁殖, 防止食品腐败变质, 具有降低相应食品的杀菌强度的作用^[2]; 且有实验表明: 抗菌肽无致畸变作用, 无蓄积毒性, 且不容易产生抗药性^[4], 因而寻

找和开发应用新的抗菌肽工作越来越受到重视。本研究即以番茄汁为载体对新疆家蚕抗菌肽在食品工业中的应用进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

新疆家蚕抗菌肽(以下简称抗菌肽) 由新疆生物资源与基因工程重点实验室提供。其制作简介: (1) 抗菌肽菌株构建。将克隆获得的新疆家蚕抗菌肽(cecropin-XJ) 基因构建到 pGAPZAA 重组穿梭质粒上, 转化到毕赤酵母 SMD1168 菌株中, 获得了含有新疆家蚕抗菌肽基因的毕赤酵母工程菌。(2) 毕赤酵母工程菌的培养。将毕赤酵母工程菌菌种按一定比例接入种子培养基中, 进行培养。根据需要培养液等比例放大, 接种量不变, 即得抗菌肽发酵液。(3) 粗品抗菌肽的获得。将抗菌肽发酵液进行 9000r/min 离心 10min, 取上清液, 煮沸 10min(杀死残余菌体), 再次以 9000r/min 离心 10min, 取上清液进行旋转蒸发, 将旋转蒸发后的发酵液置于 -80℃ 冰箱冷冻, 当发酵液完全冰冻后进行冷冻干燥, 得到的干粉

收稿日期 2006-03-24

*通讯作者

基金项目: 新疆生物资源与基因工程重点实验室开放项目基金资助项目(XJDX0201-2004-08)

作者简介: 郑力(1969-), 男, 讲师, 硕士研究生, 研究方向为食品工程。

即为抗菌肽粗品。(4) 抗菌肽的抑菌活性检测。采用琼脂孔扩散法观察不同培养条件下毕赤酵母工程菌液所形成的抑菌圈大小。计算不同培养条件下发酵液的抑菌圈直径(D_i)与抗生素对照(常用10万单位氨苄青霉素 Amp)抑菌圈直径(D_{Amp})的比值(D_i/D_{Amp})来判断其抑菌活性,要求其值应在0.85~1之间。

番茄 乌鲁木齐市售鲜番茄;砂糖为售一级品;柠檬酸(食用级) 市售;盐酸、氢氧化钠 分析纯;大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 本实验室;金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 新疆大学生命科学与技术学院微生物室所;化脓放线菌(*Actinomyces pyogenes*) 新疆医科大学第一附属医院;鸡沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、牛布氏杆菌(*Brucella bovis*) (544A国际标准株) 新疆兽医研究所。

1.2 仪器

打浆机 ZDJ-01A(DJ-330) 科器;胶体磨 DJM-50L 上海东华高压均质机厂;手持式糖度计 WYT-P(50%) 成都光学;酸度计 pH211C 哈纳;电子分析天平 AG-204 梅特勒;超级恒温水浴锅 DKB-501A 精宏;隔水式恒温培养箱 GNP-9080 精宏;超净工作台 SW-CJ-IF 苏静;医用灭菌器 LDZX-40BI 申安。

1.3 方法

1.3.1 番茄汁制作

1.3.1.1 工艺流程

鲜番茄→拣选→清洗、切块→打浆、取汁→混合配料→预热→均质、过滤→加不同量的抗菌肽、混匀、趁热装瓶封盖→杀菌、冷却→保温观察→评价品质

1.3.1.2 工艺要点说明

(1) 番茄拣选:选取无虫蛀、霉烂,色泽鲜红、大小基本一致的新鲜果。

(2) 打浆:采用一道打浆(脱除番茄籽皮,筛板孔径1.5mm),为防氧化变色打浆时喷入0.25%的VC溶液。

(3) 预热:采用85℃,2min条件钝化酶。

(4) 配料:在番茄汁中配入砂糖、柠檬酸和复合稳定剂,最终可溶性固形物达14%、pH3.9。

(5) 均质过滤:用胶体磨均质并过200目滤布,弃渣。

(6) 杀菌冷却:番茄汁均质过滤后趁热装瓶封盖,使用超级恒温水浴锅加热(具体杀菌温度和时间见表2),达到指定温度下锅,加热至预定时间后出锅,以流动的自来水冷却至室温。

(7) 保温、检查:在37℃下保温7d,每天取样检验(pH值、细菌总数、感官评价)。

1.4 抗菌肽的抑菌效果试验

1.4.1 单因素试验

1.4.1.1 不同pH条件下抗菌肽的溶解度试验

按参考文献[5]配制pH2~12的缓冲溶液,称取500mg抗菌肽分次逐量向一定体积不同pH缓冲溶液试管中添加,边加边振荡至不再溶解为止,用减量法确定抗菌肽的溶解度。

1.4.1.2 不同pH条件下抗菌肽是否具有抑菌活性的检验试验

按1.4.1.1法配制pH2~12的缓冲溶液,并分别配成含 500×10^{-6} 抗菌肽的不同pH值的缓冲溶液,参照琼脂孔穴扩散法[6],以不加抗菌肽的不同pH值的缓冲溶液为对照,分别向孔中加入10 μ l含抗菌肽的不同pH值的缓冲溶液,做抑菌试验。

1.4.1.3 耐热性试验

由于长时间煮沸对抗菌肽的抑菌活性无影响[7],故本试验只对其进行100℃以上的耐热性试验。配制一定浓度(200mg/ml)的抗菌肽溶液分别在不同温度(105、110、115、120℃)下各处理5min,冷却后以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为检验对象,参照琼脂孔穴扩散法做抑菌试验,以判别抗菌肽的耐热性。

1.4.1.4 抗菌肽对部分菌抑菌程度的确定试验

为了解抗菌肽对部分菌具有抑菌作用时所需达到的使用量,按表1进行试验。

1.4.2 正交试验

番茄为热敏性蔬菜原料,经80℃以上热处理后番茄

表1 抗菌肽抑菌浓度的测定方法
Table 1 Determination method on antibacterial concentration of cecropin-XJ

试管号	1	2	3	4	5	6	对照
无菌水(ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
2mg/ml抗菌肽溶液(ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	弃去
灭菌培养基(ml)	9	9	9	9	9	9	9
实验菌悬液(1:10)(ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
抗菌肽实际用量($\times 10^{-6}$)	200	100	50	25	12.5	6.25	0

注:①将受试菌在临用前1d接种至营养肉汤培养基中,在35℃培养18~24h,临用前用无菌水稀释10倍,作为试验菌悬液。②将表1中的试管置35~37℃培养24h,观察试管中的菌是否生长。

酱、汁均带有明显的蒸煮味,影响其口感,所以尽管众所周知番茄营养丰富,尤其是番茄红素对人体所独具的一些特殊生理功效,人们都希望多食用它,但加工后的番茄汁因风味不佳一直未能被消费者广泛接受。本实验通过在番茄汁中添加微量抗菌肽,利用其抑菌功能以达到降低番茄汁的热杀菌强度来达到提高品质的目的。以杀菌温度、热处理时间和抗菌肽用量为考察因素进行试验。番茄汁的加工方法如 1.3.1 所述,试验表头见表 2。检测评价方法:样品置于 37℃ 条件下培养 7d,参照 GB4789.2、GB4789.3 方法^[8]进行微生物检测、风味评价和 pH 值检测。

表 2 因素水平表
Table 2 Factors and levels of orthogonal test

因素	水平		
	1	2	3
A 杀菌温度(℃)	65	75	85
B 热处理时间(min)	5	10	15
C 抗菌肽添加浓度($\times 10^{-6}$)	10	20	30

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 不同 pH 条件下抗菌肽的溶解度试验

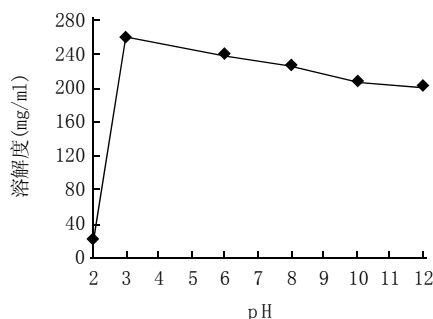


图 1 抗菌肽在不同 pH 条件下的溶解度
Fig.1 Solubility of cecropin-XJ at different pH values

由图 1 可知:抗菌肽的溶解度除在 pH2 时较低,约为 20mg/ml 外,随 pH 值升高其溶解性良好,在 pH3 时溶解性最好约为 260mg/ml 以上, pH4~12 之间溶解性变化不大,处于 210~240mg/ml 左右。一方面抗菌肽在食品中的用量一般很小在 10^{-6} 级;另一方面食品的 pH 值范围一般在 2.5~9 之间。这说明,将抗菌肽应用于一般的酸性果蔬饮料中,在一定用量范围内是可以溶解的。

2.1.2 不同 pH 条件下抗菌肽是否具有抑菌活性的检验试验

试验结果(见图 2)表明,加入抗菌肽的缓冲溶液比纯缓冲溶液具有明显的抑菌作用。抗菌肽的抑菌圈在酸性至中性范围内明显且基本保持不变;在碱性范围内有

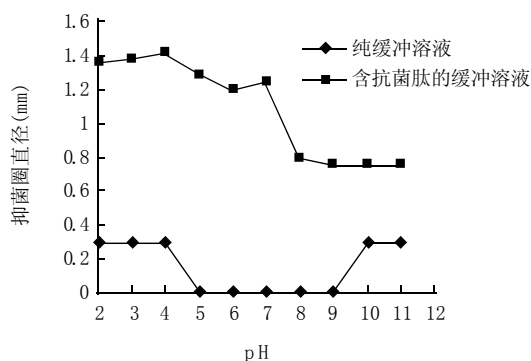


图 2 不同 pH 缓冲溶液对抗菌肽抑菌活性的影响
Fig.2 Effects of different pH values of buffer on antibacterial activity of cecropin-XJ

抑菌圈,但明显比酸性范围内的直径小,说明酸基本不影响抗菌肽的抑菌活性,而碱对抗菌肽的抑菌活性有一定的抑制作用。大多数果蔬饮料的 pH 值均在酸性范围,因此将抗菌肽应用于一般的酸性果蔬饮料应具有抑菌效果。

2.1.3 耐热性试验

将在不同温度下进行 5min 热处理与未经热处理的抗菌肽一起进行抑菌实验,结果表明(见图 3)经热处理与未经热处理的抗菌肽对大肠杆菌的抑菌圈大小无差异,但与原注液液孔圈直径(图 3 中打孔圈直径)相比均有明显的抑菌圈,且对金黄色葡萄球菌结果一致,说明抗菌肽有很强的热稳定性。但经热处理的抗菌肽的抑菌圈呈透明状,未经热处理的抗菌肽的抑菌圈呈不透明状,分析认为是实验用抗菌肽带菌(其不能抑制的菌类)繁殖所致,故若将此抗菌肽应用于不杀菌的产品时最好事先对抗菌肽灭菌后使用。耐热性实验说明将抗菌肽应用于一般的酸性果蔬饮料时,在其杀菌温度范围内不会影响抗菌肽的抑菌效果。

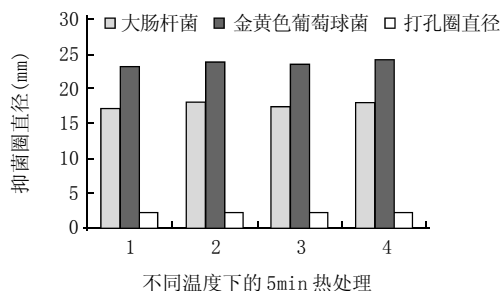


图 3 抗菌肽热稳定性检测
Fig.3 Heat-stable determination of cecropin-XJ

2.1.4 抗菌肽对部分菌的抑菌程度确定试验

试验结果表明对不同细菌达到抑菌效果所需的量不同,但对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、牛布氏杆菌、鸡沙门氏菌、化脓放线菌等均有不同程度的杀灭抑制作

表3 抗菌肽 cecropin-XJ 的有效抑菌浓度
Table 3 Antibacterial concentration of cecropin-XJ

受试菌样	样号						对照(0)
	1 (200×10^{-6})	2 (100×10^{-6})	3 (50×10^{-6})	4 (25×10^{-6})	5 (12.5×10^{-6})	6 (6.25×10^{-6})	
大肠杆菌	—	—	—	+	+	+	+
金黄色葡萄球菌	—	—	—	—	—	+	+
牛布氏杆菌	—	—	—	—	+	+	+
鸡沙门氏菌	—	—	—	—	—	—	+
化脓放线菌	—	—	—	+	+	+	+

注：+ 表示长菌，— 表示未长菌。

用(见表3)，其中抗菌肽对鸡沙门氏菌的抑菌作用最强；对金黄色葡萄球菌、牛布氏杆菌的抑菌作用次之；对大肠杆菌和化脓放线菌的抑菌作用稍弱。

2.2 正交试验

表4 正交试验结果
Table 4 Results of orthogonal test

序号	A	B	C	评价指标		
				(成品保温后)pH值	菌落状况	感官评价(分)
1	1	1	2	3.00	15/30	0
2	2	1	3	3.95	—	80
3	3	1	1	3.92	—	85
4	1	2	3	3.3	8/30	0
5	2	2	1	3.91	—	92
6	3	2	2	3.92	—	88
7	1	3	1	3.4	5/30	0
8	2	3	2	3.90	—	95
9	3	3	3	3.85	—	90

按pH值指标考察

K ₁	9.7	10.87	11.23
K ₂	11.76	11.13	10.82
K ₃	11.69	11.15	11.10
R	2.06	0.28	0.41

按感官评价指标考察

K ₁	0	165	177
K ₂	267	180	183
K ₃	263	185	170
R	267	20	13

注：1. 感官评价按：色泽(30)、风味(40)、口感(30)三方面评价，总分100；0分：由于样品出现菌落生长已不具备食用价值，故评价分为零分。

2. 菌落状况：“—”表示无菌落出现；“15/30”表示30份平行样中有15份出现菌落生长。

由表4试验结果可见：从pH值指标看，由极值R可知：各因素对番茄汁品质影响的重要程度依次为：A(加热杀菌温度) > C(抗菌肽添加浓度) > B(杀菌时间)，此结论与罐藏食品的热杀菌理论一致。显然，对致病菌和食品腐败菌而言，从微生物学角度看温度的高低将直接决定其能否存活与繁殖，故其影响因子值最大；抗菌肽作为抑菌因子的目的是抑制特定菌群的繁殖，从而降低杀菌强度，是杀菌的辅助因子，所以位列其次；杀菌时间的R值较大也说明，在一定杀菌温度下，必须

保持一定的时间方可达到对食品的杀菌效果，时间长短取决于杀菌温度，故相对而言其影响最小。由pH值指标从表4可得最佳工艺条件组合为A₂C₁B₃。

从感官评价指标看，由极值R可知：各因素对番茄汁品质影响的重要性依次为：A(加热杀菌温度) > B(杀菌时间) > C(抗菌肽添加浓度)，此结论与上述结果有差异，分析认为：番茄为热敏性物料，在一定杀菌温度下，加热时间越长则其色泽、口感、风味等感官指标必然下降越严重，所以杀菌时间对番茄汁品质影响的程度较大；另一方面，虽然抗菌肽是天然提取物，但并非为番茄自身内容物，必然会对番茄汁的风味和口感产生一定影响，从试验结果看其影响程度弱于加热时间。由分析可知，这一结论与从pH值角度出发得到的结论并不矛盾。同样可由感官评价指标从表4得到最佳工艺条件组合为A₂C₃B₂。

总体而言，由于pH值的高低最终影响的也是感官指标，且两结论对比，得到的最重要影响因子的结论是一致的，故以感官评价指标得到的最佳工艺条件组合为A₂C₃B₂，是将抗菌肽应用于番茄汁加工中的最佳条件，即采用加热杀菌温度为75℃、杀菌时间为15min、抗菌肽添加浓度为 20×10^{-6} 。

3 结 论

通过以上试验，为新疆家蚕抗菌肽的工业化应用提供了一定的科学依据。必须说明，由于实验室条件所限，无法进行超高温瞬时灭菌实验，但分析认为：抗菌肽可用于番茄汁的UHT(一般为135~150℃、1~3min)工艺，虽无法缩短杀菌时间，但在相同杀菌时间条件下可降低杀菌温度，在工业化生产中则可大大降低生产动力成本，因而抗菌肽的工业化应用前景广阔。

参考文献：

- [1] 刘毅, 宁正祥. 天然食品防腐剂—抗菌肽[J]. 食品科学, 1999, 20(11): 18-21.
- [2] 龙彪, 彭志英, 赵谋明. 新型生物防腐剂——昆虫抗菌肽[J]. 中国食品添加剂, 2004(5): 32-36.
- [3] 宫霞, 施用晖, 乐国伟. 昆虫抗菌肽生物学活性及其应用前景[J]. 中国畜牧杂志, 2004(8): 37-40.

异硫氰酸烯丙酯的分子包埋物在不同温度下的控制释放

李学红^{1,2}, 金征宇¹

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036

2. 郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002)

摘 要: 本论文利用 β -环糊精对异硫氰酸烯丙酯进行分子包埋, 将液态油转变为固体的包合物粉末, 同时对其释放特性进行研究。结果表明, 异硫氰酸烯丙酯可以和 β -环糊精形成包合物, 包合物中异硫氰酸烯丙酯的释放速度与环境的相对湿度密切相关, 释放过程可以用Avrami方程进行较好的拟和。环糊精的包埋释放反应是一个动态的可逆过程, 在密闭体系中存在一个异硫氰酸烯丙酯的顶空平衡浓度。

关键词: 异硫氰酸烯丙酯; 环糊精; 包埋; 控制释放

Controlled Release of Included Allyl Isothiocyanate at Various Relative Humidities

LI Xue-hong^{1,2}, JIN Zheng-yu¹

(1. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China

2. College of Food and Biological Engineering, Zhengzhou Institute of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In this paper allyl isothiocyanate (AITC) was included by β -cyclodextrin to form a solid powder and the controlled release property of AITC from the inclusion complexes was studied. The results showed that the release rate of AITC from the β -CD-AITC complex is correlated with environmental relative humidity (RH) and the release time-courses of the complex fit well to the Avrami equation. The release reaction of CD is a dynamic equilibrium process and there is AITC equilibrium concentration in the headspace above CD-AITC complex in a sealed system.

Key words allyl isothiocyanate (AITC); cyclodextrin (CD); inclusion; controlled release

中图分类号: TS201.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)03-0139-04

异硫氰酸烯丙酯(AITC)是芥末油的主要组成成分^[1], 具有广谱的抑菌性, 特别是对于食品腐败霉菌和许多已知病原菌具有很强的抑制作用, 是一种极有开发潜力的食品防腐剂^[2-4]。近年来国外对异硫氰酸烯丙酯在食品保藏中的应用进行了大量的研究, 并尝试应用于食品包装材料中^[5-7]。

但异硫氰酸烯丙酯的强烈气味及快速挥发性, 严重限制了其应用的范围。本文利用环糊精对异硫氰酸烯丙酯进行分子包埋制成固态包合物粉末, 对包合物中异硫

氰酸烯丙酯的释放行为进行较为深入的研究, 以期了解异硫氰酸烯丙酯的控制释放特性及机理, 为其以后在实际领域中的应用提供基础的实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

异硫氰酸烯丙酯(AITC, 纯度99%) 上海西宝生物公司; β -环糊精(β -CD, 纯度99%) 上海西宝生物公司; 正己烷、无水乙醇等。

收稿日期: 2006-02-28

作者简介: 李学红(1969-), 女, 副教授, 博士研究生, 主要从事食品加工与保藏方面的研究。

- [4] 卢晓凤, 杨星勇, 程惊秋, 等. 昆虫抗菌肽及其研究进展[J]. 药学报, 1999, 34(2): 156-160.
- [5] 武汉大学. 分析化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1995: 73-81.
- [6] HULTMARK D, STEINER H, RASMUSON T, et al. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*[J]. European Journal of

Biochemistry, 1980, 106: 7-16.

- [7] 刘忠渊, 张富春, 蔡伦, 等. 酵母菌中表达的新疆家蚕抗菌肽(cecropin-XJ)的特性研究[J]. 微生物学报, 2003, 43(5): 636-638.

- [8] GB/T4786.1~4789.3.1-2003 食品卫生微生物学检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.