

9-11-2024

Advance on biosynthesis of antibacterial peptides and its application in food preservation

SU Yan

Hefei Technology College, Hefei, Anhui 238000, China

LI Rong

Chaohu University, Hefei, Anhui 238000, China, lirong@chu.edu.cn

Follow this and additional works at: <https://www.ifoodmm.cn/journal>

Recommended Citation

Yan, SU and Rong, LI (2024) "Advance on biosynthesis of antibacterial peptides and its application in food preservation," *Food and Machinery*: Vol. 40: Iss. 7, Article 30.

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2024.60056

Available at: <https://www.ifoodmm.cn/journal/vol40/iss7/30>

This Advances is brought to you for free and open access by Food and Machinery. It has been accepted for inclusion in Food and Machinery by an authorized editor of Food and Machinery.

抗菌肽的食品保鲜应用及生物合成研究进展

Advance on biosynthesis of antibacterial peptides and its application in food preservation

苏 琰¹ 李 融²

SU Yan¹ LI Rong²

(1. 合肥职业技术学院, 安徽 合肥 238000; 2. 巢湖学院, 安徽 合肥 238000)

(1. Hefei Technology College, Hefei, Anhui 238000, China;

2. Chaohu University, Hefei, Anhui 238000, China)

摘要: 抗菌肽具有与抗生素不同的抑菌作用机制, 不易产生细菌耐药性, 被认为是有望在食品工业中被广泛推广的新型抗菌物质之一。尽管乳酸链球菌素已成为被允许纳入食品防腐剂的抗菌肽之一, 但抗菌肽的推广应用仍然受到生产成本较高、抑菌活性单一及稳定性较差等问题的限制。而采用复合保鲜技术和涂膜保鲜技术等将抗菌肽与其他天然保鲜剂联合使用, 可有效提高抗菌肽的抑菌效率。此外, 重组表达技术是实现规模化生产抗菌肽最经济和科学有效的途径之一, 且通过人工智能设计优化抗菌肽的结构可提升其稳定性及抑菌效率。文章就抗菌肽在食品保鲜中的应用现状及生物合成研究进展进行了综述, 并对目前尚存在的问题和研究前景提出了思考和建议。

关键词: 抗菌肽; 复合保鲜剂; 涂膜保鲜技术; 重组表达; 生物合成

Abstract: Antibacterial peptides have unique antibacterial mechanisms different from antibiotics, which are safe and less likely to cause bacterial resistance. Antibacterial peptides have significant advantages and extremely broad application prospects, which have the potential to become one of the widely used antimicrobial substances in the food industry. Currently, Nisin is allowed as food preservative. However, the promotion and application of antimicrobial peptides are still limited by high

production costs, single antibacterial activity, and poor stability. The use of compound preservative technology and coating preservation technology can effectively improve the antibacterial efficiency by combining antimicrobial peptides with other natural preservatives. In addition, recombinant expression technology is the most economically valuable and scientifically effective way to achieve large-scale production of antimicrobial peptides, and the stability of antimicrobial peptides can be achieved through artificial intelligence design and optimization of their structure. This review summarizes the current application status and biosynthesis research progress of antimicrobial peptides in the food industry, and puts forward thoughts and suggestions on the existing problems and research prospects.

Keywords: antimicrobial peptides; composite preservative; coating preservation technology; recombinant expression; biosynthesis

病原性细菌的污染会导致食品腐败变质从而引发食源性疾病(foodborne disease)。常用的化学合成防腐剂包括己二烯酸、苯甲酸以及丙酸类。天然防腐剂包括以中草药提取物等为代表的植物源性防腐剂, 以壳聚糖等为代表的动物源性防腐剂, 以及以乳酸链球菌素(Nisin)等为代表的微生物源性防腐剂。天然防腐剂相比较而言更加绿色安全, 因此备受关注。

世界卫生组织在 2022 年 7 月发布的报告中分析了自 2017 年以来全球 27 个国家和地区抗病原微生物药物的使用情况及病原微生物的耐药性趋势。抗生素耐药性难题已然成为全球面临的严峻挑战, 开发新的“替抗”生物制剂刻不容缓。与传统抗生素相比, 乳酸链球菌素等天然抗菌肽, 因具抑菌活性且安全无毒害, 能最大限度减少微生物污染导致食品品质降低的负面影响, 且不易产生细菌耐药性, 被认为是有望在食品工业中推广应用的

基金项目: 安徽省教育厅高校自然科学重点研究项目(编号: KJ2021A1386); 安徽省高校青年骨干人才国内访学研修项目(编号: gxgnfx2021199); 巢湖学院科学研究重点项目(编号: XLZ-202006); 合肥职业技术学院分子生物学与基因工程技术科技创新团队项目(编号: 2022Akjcx03)

作者简介: 苏琰, 女, 合肥职业技术学院副教授, 硕士。

通信作者: 李融(1983—), 男, 巢湖学院讲师, 硕士。

E-mail: lirong@chu.edu.cn

收稿日期: 2024-04-26 **改回日期:** 2024-06-25

新型抗菌物质^[1-2]。文章拟对抗菌肽在食品保鲜中的应用现状及生物合成研究进展进行综述,并对尚存在的问题和应用前景进行了讨论和展望,旨在为新型抗菌物质的研发提供思路。

1 抗菌肽概述

Zeya 等^[3]从动物白细胞中分离出具有抗菌活性的碱性多肽,即抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)。该多肽存在于各类生物体内,是免疫系统固有免疫的重要组成部分之一。

1.1 抗菌肽的分类

抗菌肽常根据其来源和结构进行分类(见图1)。

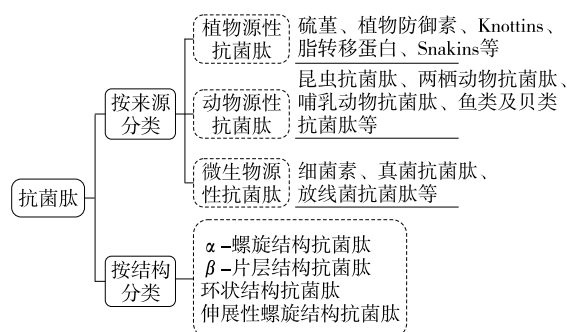


图1 抗菌肽的分类

Figure 1 Classification of antimicrobial peptides

Boman 等^[4]从惜古比天蚕(Hyatophoracecropia)体内分离获得了昆虫抗菌肽天蚕素(Cecropins),并验证了其免疫活性。研究较深入的动物源性抗菌肽还有贻贝肽(Mytilin)、滑瓜蟾素(Magainin)以及蜂毒肽(Melittin)等^[5-7]。其中,Cecropins 和 Magainin 的结构均属于 α -螺旋抗菌肽。哺乳动物抗菌肽广泛存在于动物的巨噬细胞、中性粒细胞和黏膜上皮细胞等,以阳离子肽为主。例如人的抗菌肽根据结构分类包括防御素(Defensin)、Cathelicidin 及组蛋白家族(Histatin)等^[8]。人类 Defensin 家族种类较多,而 Cathelicidin 家族只有 LL-37,是由其前体 hCAP-18 的 C 端断裂产生,具有广谱抗菌活性^[9]。植物抗菌肽存在于植物的大部分组织中,有助于抵抗外来病原体入侵,常根据其多肽结构进行分类^[10]。微生物源性抗菌肽既可以依据来源分为细菌源性、真菌源性以及放线菌源性,也可以根据是否由核糖体分泌产生来分类。与其他源性抗菌肽相比,微生物源性抗菌肽种类多、易规模化生产,因此更有应用前景。

此外,抗菌肽还可以根据氨基酸的组成特点进行分类,如富含脯氨酸的肽、富含组氨酸的肽和富含甘氨酸的肽等,氨基酸的组成与其抑菌机制有关,例如富含脯氨酸的抗菌肽通过膜渗透而非溶细胞性的途径进入细菌胞内^[11]。

1.2 抗菌肽的抗菌机制

抗菌肽大多属于阳离子小分子多肽,具有耐酸、耐碱、热稳定性较好等特点。抗菌肽的抑菌机制包括以细胞膜为靶位点和非膜靶向两种。膜靶向机制被认为是通过其带正电荷的氨基酸与细菌细胞膜相互之间的静电引力相结合,或通过其双亲性结构域与细菌细胞膜磷脂之间发生疏水作用,从而形成膜上的孔洞。其作用于菌体细胞膜有桶一板、地毯和环形孔等模型,无特异性的分子靶点,也因此不易产生细菌耐药性^[12]。部分抗菌肽具有作用于细胞壁或胞内物质的非膜靶向机制。Muller 等^[13]研究表明,Nisin 可作用于细菌细胞壁的脂质 II,从而干扰细胞壁的合成;Haney 等^[14]研究发现,小麦抗菌肽 Puroindoline B 能够与带负电荷的磷脂相互结合,但不会破坏脂质双层的完整性,而是穿过细菌膜与胞内的核酸相结合,从而阻断细菌核酸和蛋白质的大分子合成。抗菌肽对真菌也有一定的抑制作用,主要是通过干扰细胞壁的合成,以及破坏其细胞膜和线粒体等机制,但对大部分真核生物的细胞毒副作用较小。

2 抗菌肽的食品保鲜应用

目前准许商业化使用的天然食品防腐剂包括细菌素和植物提取物等。细菌素是某些细菌产生的一般作用于近缘细菌的抗菌多肽^[15],如大肠菌素和乳酸链球菌素。根据结构组成、分子大小、热稳定性及作用方式等,细菌素可分为羊毛硫细菌素(lantibioticsbacteriocin)和非羊毛硫细菌素(non-lantibioticbacteriocin)两大类,其中 I 类羊毛硫细菌素又可分为 Ia、Ib 和 Ic 3 个亚类,Nisin 属于 Ia 类线性羊毛硫细菌素。非羊毛硫细菌素包括 II 类热稳定的小分子肽(SHSP)和 III 类热不稳定的大分子细菌素(LHLP)^[16]。羊毛硫细菌素和小分子的热稳定肽因其热稳定性和抑菌活性,表现出较好的“替抗”应用潜力。

2.1 乳酸链球菌素的应用研究

Rogers 等^[17]研究表明,乳酸链球菌的某些代谢产物具有抑菌活性;Mattick 等^[18]进行了相关的抑菌试验,验证了乳酸链球菌的活性,证实其可抑制葡萄球菌等革兰氏阳性菌,即乳酸链球菌素。目前 Nisin 被公认为安全(GRAS),并得到欧盟和美国食品药品监督管理局的批准^[19]。中国也将其列为食品添加剂使用标准的增补,准许其应用于乳、肉制品等。Nisin 是由 34 个氨基酸残基组成的阳离子多肽,包括 NisinA 和 NisinZ 两种变体,其中 NisinA 分子式为 $C_{143}H_{230}O_{37}N_{42}S_7$,相对分子质量为 3 354.35,NisinZ 分子式为 $C_{141}H_{228}O_{38}N_{41}S_7$,相对分子质量为 3 330.31。两者均具有良好的溶解度,仅第 27 位氨基酸不同,主要表现为对多种革兰氏阳性细菌的抑制。

为了提高抑菌效率和保鲜效果,近年来更多的应用研究旨在将 Nisin 与多种不同抑菌活性的保鲜剂按配比

混合制备研发复合保鲜剂,将其掺入食品包装材料开发功能性包装材料或可食性涂膜保鲜技术等^[20]。复合保鲜剂是将作用机制不同的天然保鲜剂联合使用以提高抑菌效率的保鲜策略。Nisin 被广泛应用于抑制肉制品、水果蔬菜等食品中单核细胞增生李斯特氏菌的生长,然而其抑菌活性受多方面因素的影响,将具有不同功能的天然提取物与其按比例配制,可提高对单核细胞增生李斯特氏菌的抑菌效率和保鲜效果。可食性涂膜保鲜技术作为一种绿色健康的保鲜技术目前备受青睐,包括单一可食性涂膜和复合可食性涂膜,其中复合可食性涂膜技术由天然可食用的多糖、蛋白质等成膜基质与天然抑菌剂以及抗褐变氧化等成分混合制备。可食用涂膜技术通过隔离外环境、延缓食品氧化腐烂等达到保鲜效果,混入壳聚糖、乳酸链球菌素等具有抑菌效果的成分,能够保持抑菌剂稳定性,有效延长食品的货架期。此外,将新型纳米基

质材料如纳米纤维、纳米乳液或纳米脂质体等应用于涂膜或包装材料中,有利于提高天然抑菌剂的稳定性和抑菌效率(见表 1)。

2.2 其他抗菌肽的应用研究

实现商业化的细菌素还有片球菌素 PA-1(Pediocin PA-1)和小菌素(Micocin)等。片球菌素 PA-1 属于非羊毛硫抗生素中的小分子的热稳定肽(SHSP),对酸和热具有较好耐受性,是 II a 类细菌素中研究较为深入的一种细菌素,由 44 个氨基酸构成,对单核细胞增生李斯特氏菌的抑制效果明显,对其他革兰氏阳性菌也具有一定的广谱抗菌活性^[31]。将 PA-1 与 Nisin 相互协作可提高其对单核细胞增生李斯特氏菌的抑菌效率。Micocin 则在加拿大、美国、哥伦比亚等国被批准使用,该细菌素前体与革兰氏阳性菌细菌素的分泌方式类似,对热及强酸碱度耐受。有研究^[32]表明,Micocin 的抑菌活性显著,不易产

表 1 乳酸链球菌素的应用研究
Table 1 Research on the application of Nisin

食品	保鲜策略	结论	参考文献
金枪鱼	乳酸链球菌素和芝麻酚按比例配制成复合保鲜剂	与单独使用 NS 或 SE 的对照组相比,NS(25 μg/mL)和 SE(1.0 mg/mL)联合使用可明显抑制单核细胞增生李斯特氏菌的生长[低至 1.1~3.2 lg(CFU/g)],且能有效保持鱼片的品质	[21]
即食蛋制品	乳酸链球菌素和有机酸配制成复合保鲜剂	可有效控制蛋制品的冷藏配送和贮藏过程中食源性细菌的潜在生长	[22]
绿叶蔬菜	乳酸链球菌素与百里醌配制成复合保鲜剂	百里醌具有与乳酸链球菌素联合防御食源性病原菌的潜力	[23]
双孢蘑菇	以卡拉胶为成膜剂,抗坏血酸为抗氧化剂,乳酸链球菌素为抑菌剂	有效保持了采后双孢蘑菇的贮藏品质	[24]
鲈鱼鱼糜	以明胶和壳聚糖为基本组分,将乳酸链球菌素和荞麦胰蛋白酶抑制剂按比例混合制备用于食品的涂膜保鲜剂	荞麦胰蛋白酶抑制剂有效降低了乳酸链球菌素的酶解作用,相互协作利于鲈鱼鱼糜的保鲜,延长了货架期	[25]
卤蛋	以壳聚糖为涂膜基质,乳酸链球菌素和 ε-聚赖氨酸盐为抑菌剂,茶多酚和抗坏血酸为抗氧化剂制备卤蛋的涂膜保鲜剂	有效保持了卤蛋制品的品质,且能够延长食品货架期	[26]
草莓	在 N-琥珀酰壳聚糖(NSC)中加入乳酸链球菌素和不同浓度的紫苏精油制备草莓的抗菌涂膜材料	通过红外光谱分析、电子显微镜扫描、X 射线衍射测量、抑菌性及热稳定性分析,该保鲜策略对金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌等具有良好抗菌活性和抗氧化作用,是一种环保安全的食品保鲜材料	[27]
樱桃番茄	明胶-壳聚糖/乳酸链球菌素-玉米淀粉(GEL-CS/N-COS)为涂膜材料	可食用的抗菌食品包装材料表现出良好的抗菌活性和稳定性,可有效应用于果蔬保鲜	[28]
鸡肉和乳酪制品	基于羟丙基甲基纤维素和 κ-卡拉胶复合膜的鼠李糖脂功能化纳米材料基质,以茶多酚和抗坏血酸作为抗氧化剂,乳酸链球菌素作为抑菌剂	提高乳、肉制品的质量和保质期,保证了食品安全性	[29]
鸡肉	将迷迭香提取物制备成纳米乳剂并添加乳酸链球菌素	食品涂层与迷迭香提取物(纳米乳剂形式更优)及乳酸菌素等结合,有效延长了食品保质期,利于食品保鲜	[30]

生耐药性,适用于肉类的保鲜。

罗伊氏细菌素(Reuterin)在加工食品中也可用作天然防腐剂,Yehia 等^[33]研究耐药性细菌时,将 Nisin 与 Reuterin 两种抗菌肽按比例混合协同作用,结果表明,两者质量浓度分别为 25.6,5.2 mg/mL 时,可有效抑制耐药菌。Ying 等^[34]将唾液乳杆菌表达的细菌素 XJS01 应用于猪肉保鲜,对抑菌活性和肉的品质相关指标进行检测,结果表明,XJS01 对金黄色葡萄球菌的抑菌活性明显,是一种具有应用前景的肉类防腐剂。侧孢短芽孢杆菌 S62-9 表达的细菌素 brevilaterin 和解淀粉芽孢杆菌表达的 PJAP,分别被应用于草莓和牛奶保鲜,两者均对金黄色葡萄球菌的抑菌活性显著^[35-36]。

徐宇辰等^[37]将源自杂交斑纹鲈鱼的抗菌肽 Piscidin 1(Pis-1)与聚乳酸(PG/PLA)制备成纳米纤维膜,用于海鲈鱼鱼肉的保鲜,结果表明,该复合保鲜材料对腐败希瓦氏菌具有显著的持续抑菌效果。李若冰等^[38]研究表明,将从酒糟大黄鱼中分离获得的抗菌肽 FAH34 应用于水产腌制食品的保鲜,其对食源性致病菌副溶血性弧菌的最低抑菌质量浓度(MIC)为 7.80 $\mu\text{g/mL}$,且表现出良好的热稳定性。Shi 等^[39]研究了水牛乳中分离的抗菌肽 BCp12 对牛奶中金黄色葡萄球菌的抑菌机制,发现其对细菌具有双重靶向作用,且具有良好的应用前景。王丽芳等^[40]将龙井茶的抗菌肽提取物应用于冷鲜肉保鲜,检测其抑菌活性,并通过检测龙井茶叶抗菌肽对细菌的菌膜渗透率、磷离子泄漏、DNA 电泳迁移率及利用透射电子显微镜检测细菌细胞膜孔洞等试验研究了其抑菌机制。Wang 等^[41]从辣木籽中提取了抗菌肽 MOp2,并与疏基壳聚糖复配应用于草鱼保鲜,结果表明其有效抑制了食源性细菌的生长。

3 抗菌肽的生物合成

3.1 抗菌肽的重组表达

传统抗菌肽的制备方法包括从生物有机体内直接提

取或化学方法合成,由于抗菌肽的相对分子质量小,且含量低,导致分离纯化步骤繁琐,成本较高;而化学合成方法则存在产物活性不稳定且工业化生产困难等缺点。随着重组表达技术的日趋发展成熟,利用工程菌表达重组抗菌肽可实现其规模化生产^[42]。应用于抗菌肽生产的基因工程表达系统分为原核系统和真核系统,原核表达系统应用的工程菌主要包括大肠杆菌和枯草芽孢杆菌,后者主要以酵母细胞、昆虫细胞及哺乳动物细胞等为主。

大肠杆菌的遗传背景、代谢途径和蛋白表达机制清楚,是应用最早且最常见的表达系统之一,具有操作简便、载体系统完备、易培养、成本低、表达效率高等优点,且表达产物的分离和纯化技术成熟。但大肠杆菌表达系统由于缺乏修饰蛋白的能力,易形成包涵体结构及产生内毒素,导致抗菌肽在后期表达因其抑菌活性而影响宿主菌,以及表达载体和培养条件的选择也对抗菌肽生产有一定影响。酵母表达系统易进行翻译后的修饰加工。影响真核表达系统的因素有 mRNA 5'端非翻译区的组成长度、A+T 含量、UTR 序列及基因的拷贝数等,且工程菌本身对外源抗菌肽有溶解作用,这些因素对重组抗菌肽的表达均造成一定影响。

此外,在抗菌肽的重组表达策略设计中,还应考虑:根据靶基因的来源选择合适的宿主与载体;强启动子与纯化标签的选择;以及根据重组表达蛋白的类型选择合适宿主等。近年来,基因工程技术成功表达了多种重组抗菌肽并验证了其抑菌活性,为重组抗菌肽的应用提供了理论依据(见表 2)。

3.2 抗菌肽的结构优化

目前,抗菌肽的应用还存在抗菌效率低于抗生素,部分重组抗菌肽因其基因序列较长导致生产成本较高等亟须解决的问题。

抗菌肽的电荷数、螺旋结构及疏水特性等结构特点是其抑菌活性的重要决定因素。基于这些结构特点的分

表 2 重组抗菌肽表达
Table 2 Recombinant expression system of antimicrobial peptides

表达系统	重组抗菌肽	表达宿主	表达载体	参考文献
原核表达系统	myticusin-1	大肠杆菌 BL21(<i>Escherichia coli</i>)	pET28a	[43]
	JAMF1	大肠杆菌 BL21(DE3)(<i>Escherichia coli</i>)	pET22b	[44]
	Cecropin B	大肠杆菌 BL21(<i>Escherichia coli</i>)	pKSEC1	[45]
	β -Defensin 118	大肠杆菌 Rosetta(DE3)(<i>Escherichia coli</i>)	pET32a	[46]
	CiMAM	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	pP43-2CiMAM-GFP	[47]
真核表达系统	Cathelicidin-1	毕赤酵母 GS115(<i>Pichia pastoris</i>)	pGAPZaA	[48]
	Molluscidin	毕赤酵母 X-33(<i>Pichia pastoris</i>)	pPICZaA	[49]
	Cecropin P1	酿酒酵母 INVSc1(<i>S. cerevisiae</i>)	pYES2/CT-a factor	[50]
	Mytichitin-CB	莱茵衣藻 CC-125(<i>C. reinhardtii</i>)	pRBCS2-Ble-3 $\times$ Mytichitin-CB-HA-6 $\times$ His	[51]
	ALFPm3	莱茵衣藻 CC-849(<i>C. reinhardtii</i>)	pH2A-Pm3	[52]

析为设计和合成抗菌肽提供了思路,通过结构优化提高其活性和稳定性,是抗菌肽生物合成的研究方向之一。酸碱度为中性时,大多数抗菌肽均表现为带正电荷的阳性多肽,通过静电作用吸附于细菌表面从而进一步破坏细菌细胞膜,因此适当增加其所携带的正电荷数,可提高抑菌活性;抗菌肽的疏水残基和 α -螺旋结构均有利于促进其与细菌细胞膜的结合。

抗菌肽的结构优化途径主要包括:① 替换氨基酸。在不影响其抑菌活性的情况下,可对抗菌肽序列上的部分氨基酸进行替换,通过调控其结构属性提高抑菌效率。例如赖氨酸可提高多肽的疏水性,色氨酸能够促进多肽形成两亲性结构。天然的 α -螺旋阳离子抗菌肽(CAP)序列中只有约 2% 含有 4 个或更多连续带正电荷的氨基酸(Lys/Arg),Trace 等^[53]在天然抗菌肽的 N 端设计了 6 个连续赖氨酸序列(KKKKKK-AAFAAWAAFAA-NH₂),并将其命名为抗菌肽 6K-F17,其独特的序列设计赋予该抗菌肽的高抗菌活性,并提高了其对蛋白酶水解的抗性和稳定性。② 修饰抗菌肽化学结构。将线性的抗菌肽连接环化、在抗菌肽结构中引入其他非氨基酸结构、对抗菌肽的末端进行化学修饰以及将单一抗菌肽多聚化等,均被证实是能够有效提高其抑菌效率和稳定性的优化策略。例如,Kamysz 等^[54]对 LL37 和 histatin 5 进行了环化合成并对其生物活性及构象进行了对比分析。结果表明,环化的抗菌肽均不影响其抗菌活性和溶血活性,且表现出更高的稳定性。Li 等^[55]将抗菌肽 Chex1-Arg20 连接形成二聚体,并研究其对多重耐药性的鲍曼不动杆菌的抑菌活性,与单体抗菌肽相比,二聚体结构的抑菌活性明显提高,且能缓解细菌感染导致的炎症等。此外,还可以通过将抗菌肽与其他抗菌物质结构偶联制备复合材料,或在制备复合保鲜剂时利用纳米分子材料提高其抗菌稳定性。

随着合成生物学的发展,利用人工智能分析天然抗菌肽的结构,对其活性基团结构及空间构象等预测分析,并据此进行优化设计和改造,以期合成在实际应用中稳定性高和抑菌活性强的重组抗菌肽,推动抗菌肽在各领域的应用发展。例如,环化肽策略之一的订合抗菌肽(StAMPs)是将抗菌多肽的侧链与侧链或其肽链末端订合,形成一种“订书针”构象。Mourtada 等^[56]结合计算机辅助技术,基于天然抗菌肽 magainin II(Mag2)设计了一种将 i 与 i+4 或 i+7 位的两个侧链订合连接的订合肽算法,分别命名为 Mag(i+4)和 Mag(i+7)并进行抗菌活性筛选。此外,在订合抗菌肽 Mag(i+4)15(A9K)的基础上设计了双订合抗菌多肽 Mag(i+4)1,15(A9K, B21A, N22K, S23K),结果表明,该设计使抗菌肽在抗蛋白酶水解、稳定性及抑菌效果方面均有提高。

4 重组抗菌肽的应用研究

重组表达技术有望降低抗菌肽的生产成本,实现其规模化生产和推广应用,重组抗菌肽在食品中的保鲜应用研究表明其与天然抗菌肽同样具有抑菌保鲜应用前景。何成霞^[57]利用原核系统重组表达天蚕素抗菌肽,通过单因素试验确定了工程菌融合表达的因素,筛选出高表达的基因工程菌株,采用镍离子亲和层析法纯化重组蛋白,纯化率达到 87% 以上,回收率约为 21.0%,天蚕素抗菌肽对大肠杆菌(ATCC8099)的 MIC 为 0.125 mg/mL。并将重组天蚕素应用于橙汁保鲜中,结果表明,其能有效抑制橙汁中微生物的生长,为天蚕素抗菌肽在果汁防腐中的应用奠定了试验基础。陶雪菊^[58]利用酵母系统表达 LL-37 并采用离子交换层析法来纯化表达的 LL-37,结果表明,工程菌表达的 LL-37 对大肠杆菌的 MIC 达到 51.2 μ g/mL,对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 40 μ g/mL,在牛奶和鲜榨果汁等食品中能够明显抑制微生物的生长。谭小千^[59]将重组鲑鱼 Cystatin 注入乌鱼肉,分析了 4 $^{\circ}$ C 保存条件下乌鱼肉的相关品质及指标,对重组鲑鱼 Cystatin 冷藏过程中的抑菌作用、在肌细胞内的渗透性等都进行了进一步分析。Dong 等^[60]利用毕赤酵母表达系统重组表达 PMAP-37(F34-R),并进一步研究了其在李子中的抗菌性能和作用机制。结果表明,重组抗菌肽 PMAP-37 能够有效抑制细菌,最低抑制浓度为 0.12 ~ 0.24 μ g/mL。

5 结论与展望

抗菌肽作为“替抗”的首选抗菌制剂,进一步研究其抑菌机制,挖掘其在食品安全领域的潜力十分必要。但抗菌肽的应用推广仍面临以下问题:结构较为简单,导致稳定性不够,易被酶解;与抗生素相比尽管具有很多优点,但抑菌效果远低于抗生素,需要提高使用浓度,间接提高了应用成本,限制其推广。例如 Nisin 作为一种高效、安全的天然防腐剂,受其生产规模影响,市售价远高于抗生素及化学保鲜剂,严重制约了其应用推广。因此,在提高抑菌活性、稳定性及生产产能等方面亟待加强研究。

通过优化天然抗菌肽的结构,重组表达技术可实现其规模化和低成本生产,利于应用推广。为提高抗菌肽的抑菌效率,未来对于其在食品保鲜应用的研究重点应着力于以下方面:进一步深入研究基因工程技术生产重组抗菌肽,优化重组抗菌肽表达的条件,提高产能,降低抗菌肽使用成本;利用人工智能优化抗菌肽结构,提升其稳定性和抑菌效率;应用过程中将抗菌肽与其他具有不同功能的生物保鲜剂如多糖、蛋白质及脂质等天然提取物等协同使用,设计开发新型保鲜技术,引入纳米技术,通过纳米载体提高抗菌肽稳定性,以期多渠道提高其抑

菌效率,实现抗菌肽的规模化生产与商业化应用。

参考文献

- [1] 谢闰生, 李培骏, 蒋羽秋, 等. 抗菌肽偶联纳米银材料及其在医疗和食品领域的应用[J]. 食品与机械, 2024, 40(5): 219-226.
- XIE R S, LI P J, JIANG Y Q, et al. Antimicrobial peptide-coupled silver nano materials and their applications in medical and food fields[J]. Food & Machinery, 2024, 40(5): 219-226.
- [2] 杨悦, 李燕, 王小方, 等. 抗菌肽及其在食物储藏与保鲜中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(4): 9-16.
- YANG Y, LI Y, WANG X F, et al. Antimicrobial peptides and their applications in food storage and preservation[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(4): 9-16.
- [3] ZEYA H L, SPITZNAGEL J K. Antibacterial and enzymic basic pro-teins from leukocyte lysosomes: separation and identification[J]. Science, 1963, 142(3 595): 1 085-1 087.
- [4] BOMAN I L, MERRIFIELD R B, ZIMMERMANN R, et al. Chemical synthesis and enzymic processing of precursor forms of cecropins A and B[J]. Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(10): 5 852-5 860.
- [5] MITTA G, HUBERT F, NOËL T, et al. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. European Journal of Biochemistry, 1999, 265(1): 71-78.
- [6] ZOSLOFF M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor [J]. Occupational & Environmental Medicine, 1988, 45(8): 5 449-5 453.
- [7] FIDELIO G D, MAGGIO B, CUMAR F A. Interaction of myelin basic protein, melittin and bovine serum albumin with gangliosides, sulphatide and neutral glycosphingolipids in mixed monolayers[J]. Chemistry & Physics of Lipids, 1984, 35(3): 231-245.
- [8] SMET K, CONTRERAS R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins [J]. Biotechnology Letters, 2005, 27(18): 1 337-1 347.
- [9] KAHLENBERG J M, KAPLAN M J. Little peptide, big effects: the role of LL-37 in inflammation and autoimmune disease[J]. Journal of Immunology, 2013, 191(10): 4 895-4 901.
- [10] 田野, 王贵锋, 张向前. 植物抗菌肽的研究进展及其应用[J]. 现代食品科技, 2017, 33(11): 285-291.
- TIAN Y, WANG G F, ZHANG X Q. Research progress and application of plant antimicrobial peptides [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(11): 285-291.
- [11] SINGH A, DUCHE R T, WANDHARE A G, et al. Milk-derived antimicrobial peptides: overview, applications, and future perspectives[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2023, 15(1): 44-62.
- [12] 肖怀秋, 李玉珍, 林亲录, 等. 抗菌肽多靶点作用抑菌机理研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(5): 11-19.
- XIAO H Q, LI Y Z, LIN Q L, et al. Advances in multiple targets mechanism of antimicrobial peptides[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(5): 11-19.
- [13] MULLER A, ULM H, REDER-CHRIST K, et al. Interaction of type A lantibiotics with undecaprenol-bound cell envelope precursors[J]. Microbial Drug Resistance, 2012, 18(3): 261-270.
- [14] HANEY E F, PETERSEN A P, LAU C K, et al. Mechanism of action of puromycin derived tryptophan-rich antimicrobial peptides[J]. Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Biomembranes, 2013, 1828(8): 1 802-1 813.
- [15] PENG Z, XIONG T, HUANG T, et al. Factors affecting production and effectiveness, performance improvement and mechanisms of action of bacteriocins as food preservative[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 63(33): 11-14.
- [16] MOKOENA M P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review[J]. Molecules, 2017, 22(8): 1 242-1 255.
- [17] ROGERS L A, WHITTIER E O. Limiting factors in the lactic fermentation[J]. Journal of Bacteriology, 1928, 16(4): 211-229.
- [18] MATTICK A T R, HIRSCH A. A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci [J]. Nature, 1944, 154(3 913): 551.
- [19] FIELD D, COTTER P, ROSS R P, et al. Bioengineering of the model lantibiotic nisin[J]. Bioengineered, 2015, 6(4): 187-192.
- [20] 胡瀚文, 余雪健, 李旭, 等. 壳聚糖/乳酸链球菌素复合抗菌膜的制备及其性能[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(11): 13-19.
- HU H W, YU X J, LI X, et al. Preparation and properties of chitosan/nisin composite antibacterial film [J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(11): 13-19.
- [21] WU M J, DONG Q L, YAN H, et al. Bacteriostatic potential of nisin and sesamol combination against *Listeria monocytogenes* in chilled raw tuna fillets[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 183(5): 1-10.
- [22] SHRESTHA S, ERDMANN J J, RIEMANN M, et al. Ready-to-eat egg products formulated with nisin and organic acids to control *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Food Protection, 2023, 86: 1-10.
- [23] CHEN H, JI P C, QI Y H, et al. Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by thymoquinone in combination with nisin [J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 13(1): 1-17.
- [24] 商立超, 赵凤春, 弓志青, 等. 抗坏血酸联合乳酸链球菌素复合涂膜保鲜采后双孢蘑菇研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(20): 346-351.
- SHANG L C, ZHAO F C, GONG Z Q, et al. Preservation of postharvest *agaricus bisporus* by Vc/nisin composite coating [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(20): 346-351.
- [25] 李晨, 牛泽洁, 李文婕, 等. BTI 和 Nisin 复合涂膜液对鲈鱼鱼糜的保鲜效果[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(22): 8-13.
- LI C, LIU Z J, LI W J, et al. Preservation effect of composite

- coating liquid containing BTI and Nisin on *Lateolabrax japonicus* Surimi[J]. Food Research and Development, 2021, 42(22): 8-13.
- [26] LIU J B, CHENG D K, ZHANG D J, et al. Incorporating ϵ -polylysine hydrochloride, tea polyphenols, nisin, and ascorbic acid into edible coating solutions: effect on quality and shelf life of marinated eggs[J]. Food and Bioprocess Technology, 2022, 15(12): 2 683-2 696.
- [27] WANG H, GUO L, LIU L, et al. Composite chitosan films prepared using nisin and *Perillafrutescens* essential oil and their use to extend strawberry shelf life[J]. Food Bioscience, 2021, 41(4): 1-10.
- [28] CHEN J, ZHANG J M, LIU D Y, et al. Preparation, characterization, and application of edible antibacterial three-layer films based on gelatin-chitosan-corn starch-incorporated nisin[J]. Food Packaging and Shelf Life, 2022, 34(11): 1-11.
- [29] NIAZ T, SHABBIR S, NOOR T, et al. Active composite packaging reinforced with nisin-loaded nano-vesicles for extended shelf life of chicken breast filets and cheese slices[J]. Food and Bioprocess Technology, 2022, 15(4): 1 284-1 298.
- [30] MAVALIZADEH A, FAZLARA A, POUR M M, et al. The effect of separate and combined treatments of nisin, *Rosmarinus officinalis* essential oil (nanoemulsion and freeform) and chitosan coating on the shelf life of refrigerated chicken fillets[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2022, 16(6): 4 497-4 513.
- [31] RODRIGUEZ J M, MARTINEZ M I, KOK J, et al. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2002, 42(2): 92-121.
- [32] 海旭冉, 吴海青, 程超, 等. 细菌素抑菌机制和性能改进及其应用的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(11): 45-53.
- HAI X R, WU H Q, CHENG C, et al. Research progress on antibacterial mechanism, performance improvement and application of bacteriocins[J]. China Food Additives, 2023, 34(11): 45-53.
- [33] YEHA H M, ALKHURJI A F, SAVVAIDIS I, et al. Bactericidal effect of nisin and reuterin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *S. aureus* ATCC 25937[J]. Food Science and Technology, 2022, 42: 105321.
- [34] YING J P, WU G, ZHANG Y M, et al. Proteomic analysis of *Staphylococcus aureus* exposed to bacteriocin XJS01 and its bio-preservative effect on raw pork loins[J]. Meat Science, 2023, 204(6): 1-22.
- [35] NING Y, HAN P, MA J, et al. Characterization of brevilaterins, multiple antimicrobial peptides simultaneously produced by *Brevibacillus laterosporus* S62-9, and their application in real food system[J]. Food Bioscience, 2021, 42(SC): 1-9.
- [36] YING T T, WU P J, GAO L L, et al. Isolation and characterization of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and its effect on strawberry preservation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 165(6): 1-9.
- [37] 徐宇辰, 励建荣, 李婷婷, 等. 抗菌肽 Piscidin 1 PG/聚乳酸电纺纳米纤维膜的制备及其对海鲈鱼的保鲜作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(4): 102-109.
- XU Y C, LI J R, LI T T, et al. Preparation of antimicrobial peptide Piscidin 1 PG/poly(lactic acid) electrospun nanofiber membrane and its preservation effect on sea bass[J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(4): 102-109.
- [38] 李若冰, 刘嘉鑫, 金日天, 等. 酒糟大黄花鱼抗菌肽 FAH34 的抑菌活性及热稳定性[J]. 中国食品学报, 2023, 23(12): 247-254.
- LI R B, LIU J X, JIN R T, et al. Antibacterial activity, mechanism and thermal stability of antibacterial peptide FAH34 from distiller's grains *larimichthys crocea*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(12): 247-254.
- [39] SHI Y A, LI Y F, YANG K, et al. A novel milk-derived peptide effectively inhibits *Staphylococcus aureus*: interferes with cell wall synthesis, peptidoglycan biosynthesis disruption reaction mechanism, and its application in real milk system[J]. Food Control, 2023, 144(9): 1-9.
- [40] 王丽芳, 叶良, 谢忠稳, 等. 茶叶抗菌肽粗提物的抑菌活性及其对冷却肉保鲜的影响[J]. 浙江农业学报, 2022, 34(10): 2 268-2 276.
- WAN L F, YE L, XIE Z W, et al. Antibacterial activity of tea antimicrobial peptide extraction and its effect on preservation of chilled meat[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2022, 34(10): 2 268-2 276.
- [41] WANG X F, HAN M Y, ZOU L R, et al. Preparation and characterization of Pickering emulsion with directionally embedded antimicrobial peptide MOp2 and its preservation effect on grass carp[J]. Current Research in Food Science, 2023, 7(8): 1-10.
- [42] 魏岱旭, 龚海伦, 张旭维. 抗菌肽的生物合成及医学应用[J]. 合成生物学, 2022, 3(4): 709-727.
- WEI D X, GONG H L, ZHANG X W. Biosynthesis of antimicrobial peptides and its medical application[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(4): 709-727.
- [43] 杨金月, 刘璐, 何治江, 等. 厚壳贻贝抗菌肽 myticusin-1 的重组表达及功能分析[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2022, 41(1): 15-22.
- YANG G Y, LIU L, HE Z J, et al. Recombinant expression and functional analysis of the antimicrobial peptide myticusin-1 of *mytilus coruscus*[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2022, 41(1): 15-22.
- [44] ROCA P R, ADRIA L C, SAUBI C, et al. A new generation of recombinant polypeptides combines multiple protein domains for effective antimicrobial activity[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 1-7.
- [45] PARK A R, KIM S W, KIM S Y, et al. Expression of antimicrobial peptide (AMP), cecropin B, in a fused form to SUMO tag with or without three-glycine linker in *Escherichia coli* and evaluation of

- bacteriolytic activity of the purified AMP [J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2021, 13(5): 1 780-1 789.
- [46] LIN Q, XIE K H, CHEN D, et al. Expression and functional characterization of a novel antimicrobial peptide: human beta-defensin 118[J]. *Bio Med Research International*, 2020(11): 1-10.
- [47] LEE B C, TSAI J C, LIN C Y, et al. Using *Bacillus subtilis* as a host cell to express an antimicrobial peptide from the marine chordate *Cionaintestinalis*[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(2): 1-19.
- [48] 李飞航, 武浩恒, 李宏, 等. 抗菌肽 Cathelicidin-1 真核表达及发酵液抑菌活性鉴定[J]. *热带生物学报*, 2023, 14(3): 1-7.
- LI F H, WU H H, LI H, et al. Eukaryotic expression of Cathelicidin-1 and validation of its antimicrobial activity in the fermentation broth[J]. *Journal of Tropical Biology*, 2023, 14(3): 1-7.
- [49] 谭强来, 曾臻, 许莉, 等. 牡蛎抗菌肽 Molluscidin 的密码子优化、重组毕赤酵母表达及抑菌活性[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(3): 106-113.
- TAN Q L, ZENG Z, XU L, et al. Optimization and recombinant expression of antimicrobial peptide Molluscidin in *Pichiapastoris* and its antibacterial activity[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(3): 106-113.
- [50] JIANG R, ZHANG P, WU X, et al. Expression of antimicrobial peptide Cecropin P1 in *Saccharomyces cerevisiae* and its antibacterial, antiviral activity in vitro [J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2020, 50(12): 16-22.
- [51] HADIATULLAH H, WANG H, LIU Y X, et al. *Chlamydomonas reinhardtii*-derived multimer Mytichitin-CB possesses potent antibacterial properties[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 96: 21-29.
- [52] LI A, HUANG R, WANG C, et al. Expression of anti-lipopolysaccharide factor isoform 3 in *Chlamydomonas reinhardtii* showing high antimicrobial activity[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(5): 1-13.
- [53] TRACY A S, GREGORY B C, DORNA R L, et al. Positive charge patterning and hydrophobicity of membrane-active antimicrobial peptides as determinants of activity, toxicity, and pharmacokinetic stability[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 62(13): 6 276-6 286.
- [54] KAMYSZ E, SIKORSKA E, KARAFOVA A, et al. Synthesis, biological activity and conformational analysis of head-to-tail cyclic analogues of LL37 and histatin 5 [J]. *Journal of Peptide Science*, 2012, 18(9): 560-566.
- [55] LI W, LIN F, HUNG A, et al. Enhancing proline-rich antimicrobial peptide action by homodimerization: influence of bifunctionallinker[J]. *Chem Sci*, 2022, 13(8): 2 226-2 237.
- [56] MOURTADA R, HERCE H D, YIN D J, et al. Design of stapled antimicrobial peptides that are stable, nontoxic and kill antibiotic-resistant bacteria in mice[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(10): 1 186-1 197.
- [57] 何成霞. 天蚕素抗菌肽的融合表达及其在橙汁中的抑菌研究[D]. 成都: 成都大学, 2021: 57-58.
- HE C X. Fusion expression of cecropin A and its antibacterial activity in orange juice[D]. Chengdu: Chengdu University, 2021: 57-58.
- [58] 陶雪菊. 人源抗菌肽 LL-37 在毕赤酵母中的表达及在牛奶和果汁中的保鲜应用[D]. 成都: 成都大学, 2023: 63-64.
- TAO X J. Expression of human-derived antimicrobial peptide LL-37 in *Pichiapastoris* and its application in milk and juice [D]. Chengdu: Chengdu University, 2023: 63-64.
- [59] 谭小千. 鲢鱼重组 Cystatin 对冷藏乌鱼肉片保鲜作用的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2022: 63-64.
- TAN X Q. Effects of silver carp recombinant Cystatin on preservation of frozen Mullet fillet[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2022: 63-64.
- [60] DONG C M, XU L J, LU W T, et al. Antibacterial peptide PMAP-37 (F34-R), expressed in *Pichiapastoris*, is effective against pathogenic bacteria and preserves plums [J]. *Microbial Cell Factories*, 2023, 22(1): 1-12.
- antimicrobial, antibiofilm, and antioxidant potential [J]. *Computational Biology and Chemistry*, 2022, 98: 107695.
- [70] JIANG J, HOU X, XU K, et al. Bacteria-targeted magnolol-loaded multifunctional nanocomplexes for antibacterial and anti-inflammatory treatment [J]. *Biomedical Materials*, 2024, 19(2): 025029.
- [71] PAVLICEVIC M, MARMIROLI N, MAESTRI E. Immunomodulatory peptides: a promising source for novel functional food production and drug discovery[J]. *Peptides*, 2022, 148: 170696.
- [72] KAMAL I, ASHFAQ U A, HAYAT S, et al. Prospects of antimicrobial peptides as an alternative to chemical preservatives for food safety[J]. *Biotechnology Letters*, 2022, 45(2): 137-162.

(上接第 207 页)

- [67] YI L H, QI T, MA J H, et al. Genome and metabolites analysis reveal insights into control of foodborne pathogens in fresh-cut fruits by *Lactobacillus pentosus* MS031 isolated from Chinese Sichuan Paocai [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2020, 164: 111150.
- [68] SHWAIKI L N, ARENDT E K, LYNCH K M. Anti-yeast activity and characterisation of synthetic radish peptides Rs-AFP1 and Rs-AFP2 against food spoilage yeast [J]. *Food Control*, 2020, 113: 107178.
- [69] LEON MADRAZO A, SEGURA CAMPOS M R. In silico prediction of peptide variants from chia (*S. hispanica* L.) with