

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241222001

引用格式: 赵悦, 赵荣, 吕中明, 等. γ -聚谷氨酸急性毒性和遗传毒性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(11): 179–185.

ZHAO Y, ZHAO R, LV ZM, *et al.* Study on acute toxicity and genetic toxicity of γ -polyglutamic acid [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(11): 179–185. (in Chinese with English abstract).

γ -聚谷氨酸急性毒性和遗传毒性研究

赵悦, 赵荣, 吕中明, 俞萍*

(江苏省疾病预防控制中心毒理与风险评估研究所, 南京 210009)

摘要: **目的** 评价 γ -聚谷氨酸(γ -polyglutamic acid, γ -PGA)急性毒性和遗传毒性。**方法** 采用限量法, 分别以 10000 mg/(kg • bw)的剂量 γ -PGA 灌胃给予大鼠和小鼠, 通过观察动物中毒表现及死亡情况, 检测其急性毒性; 采用 30 h 两次灌胃法, 镜检计数小鼠骨髓有微核嗜多染红细胞频率, 检测 γ -PGA 致微核作用; 采用平板掺入法, 计数 TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 菌株的回变菌落数, 检测 γ -PGA 诱导基因突变活性; 采用连续 5 d 灌胃法, 镜检计数小鼠精母细胞染色体结构畸变数目及频率, 检测 γ -PGA 致染色体畸变作用。**结果** γ -PGA 对雌雄小鼠和大鼠的急性经口最大耐受剂量(maximum tolerated dose, MTD)均大于 10000 mg/(kg • bw); 剂量达 5000 mg/(kg • bw), 未见对雌雄小鼠骨髓嗜多染红细胞的致微核作用($P>0.05$), 以及未见对小鼠初级精母细胞的致染色体畸变作用($P>0.05$); 剂量达 5000 μ g/皿, 有无 S_9 条件下, 均未对标准测试菌株 TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 表现出明显的诱变活性。**结论** 本研究条件下, γ -PGA 属于实际无毒级且无遗传毒性, 为其在食品领域的开发和应用提供了毒理学依据。

关键词: γ -聚谷氨酸; 急性毒性; 遗传毒性

Study on acute toxicity and genetic toxicity of γ -polyglutamic acid

ZHAO Yue, ZHAO Rong, LV Zhong-Ming, YU Ping*

(Institute of Toxicology and Risk Assessment, Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the acute toxicity and genetic toxicity of γ -polyglutamic acid (γ -PGA). **Methods** Acute toxicity was evaluated by oral gavage of γ -PGA at 10000 mg/(kg • bw) to rats and mice using the limit test method, with observations of toxic signs and mortality; the 30 hour double gavage method followed by microscopic examination to quantify the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow was employed to detect the micronucleus induction of γ -PGA; the plate incorporation method was utilized to enumerate revertant colonies of *Salmonella typhimurium* strains (TA97a, TA98, TA100, TA102 and TA1535) to assess the mutagenic potential of γ -PGA; a continuous 5 day gavage followed by microscopic analysis was conducted to analyze the number and frequency of chromosomal structural aberrations in mouse spermatocytes

收稿日期: 2024-12-22

第一作者: 赵悦(1991—), 女, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品和保健食品毒理学检测与功能评价。E-mail: zhaoyue@jscdc.cn

*通信作者: 俞萍(1973—), 女, 硕士, 主任医师, 主要研究方向为食品和新食品原料毒理学安全性评价与风险评估。E-mail: 337213644@qq.com

to evaluate the chromosomal aberration induction of γ -PGA. **Results** The maximum tolerated dose (MTD) of γ -PGA via acute oral administration to both male and female mice and rats was greater than 10000 mg/(kg · bw). At a dose of 5000 mg/(kg · bw), γ -PGA did not significantly increase micronucleated polychromatic erythrocytes in the bone marrow of either male or female mice ($P>0.05$), nor did it induce chromosomal aberrations in primary spermatocytes of mice ($P>0.05$). Additionally, at a dose of 5000 μ g per plate, no significant mutagenic activity was detected in the standard tested strains (TA97a, TA98, TA100, TA102 and TA1535), regardless of S_9 activation.

Conclusion Under the experimental conditions of this study, γ -PGA is classified as practically non-toxic and non-genotoxic, providing a toxicological basis for its development and application in the food industry.

KEY WORDS: γ -polyglutamic acid; acute toxicity; genetic toxicity

0 引言

γ -聚谷氨酸(γ -polyglutamic acid, γ -PGA), 又称多聚谷氨酸, 是由 *D*-谷氨酸和/或 *L*-谷氨酸单体聚合而成的直链型生物高分子物质^[1], 最初在炭疽芽孢杆菌的荚膜中被发现, 同时也存在于日本传统发酵食品纳豆黏液中^[2]。目前, 以枯草芽孢杆菌为主要生产菌的微生物发酵法是其主要生产方式^[3]。 γ -PGA 具有优良的水溶性、保水性、生物降解性、生物相容性等特性, 在食品、化妆品、农业、医药等领域均展现出了极大的应用潜力^[4-5]。特别是在食品工业中, γ -PGA 不仅可以作为绿色环保的食品包装材料^[6], 还可以作为冻干保护剂有效延长食品保质期^[7-8], 作为掩味剂、增稠剂和稳定剂等改善食品品质^[9]。此外, γ -PGA 还具有多种健康益处, 如: 促进肠道中钙和维生素的吸收^[10-11]、改善肠道菌群健康^[12]等。动物试验进一步表明, γ -PGA 还具有抗氧化^[13]、降血脂^[14]、降血糖^[15-16]、降胆固醇^[17]等多种功效。

张彩霞等^[18]依据 GB 15193.13—2003《30 天和 90 天喂养试验》, 采用 γ -PGA 掺入饲料的方式, 以 5000~15000 mg/(kg · bw)剂量对大鼠进行为期 30 d 的亚急性毒性试验。研究结果显示, γ -PGA 会显著抑制雌、雄大鼠日增重, 并导致雌、雄大鼠肝脏和肾脏重量及雄性大鼠睾丸重量与对照组相比出现显著性差异。这些结果提示, γ -PGA 可能对动物的生长发育及特定器官功能产生潜在影响。因此, 本研究依据现行 2014 版《食品安全国家标准》, 系统评价了 γ -PGA 的急性经口毒性, 并通过小鼠骨髓细胞微核试验、细菌回复突变试验和小鼠精母细胞染色体畸变试验, 对其潜在遗传毒性进行了全面评价, 旨在为 γ -PGA 的长期毒性研究及其在食品领域的安全应用和开发提供毒理学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

γ -PGA: 南京某生物科技股份有限公司, 白色粉状, 阴凉、干燥处保存, 保存期限为 2 年。

环磷酸胺(纯度 $\geq 97.0\%$)、1,8-二羟基蒽醌(纯度 $\geq 95.5\%$)(美国 Sigma 公司); 敌克松(纯度 $\geq 95.0\%$, 美国 AccuStandard 公司); 叠氮钠(纯度 $\geq 99.5\%$, 浙江东阳市天宇化工有限公司); 2-氨基苄(纯度 $\geq 97.5\%$, 瑞士 Fluka AG 公司); 丝裂霉素 C(纯度 $> 98\%$, 日本东京化成工业株式会社); 秋水仙素(纯度 $\geq 98\%$)、柠檬酸三钠、甲醇、冰乙酸(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司); 小牛血清(美国 Gibco 公司); Giemsa 染液(上海碧云天生物技术股份有限公司); 纯水(I级)。

TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535^[19]组氨酸缺陷型的鼠伤寒沙门氏菌株(活菌浓度 10^9 个/mL 以上, 美国 Moltex 公司), 经生物学鉴定符合要求, 各菌株于 37 °C 条件下增菌培养过夜; S_9 大鼠肝匀浆(纯度 10%, 江苏齐氏生物科技有限公司), 由 β -萘黄酮、苯巴比妥联合诱导, 合格证号: 23FS016D, 代谢活化系统中 S_9 浓度为 10%。

1.2 仪器与设备

PANNORAMIC MIDI 数字切片扫描系统(匈牙利 3DHISTECH 公司); Axiostar plus 生物显微镜[蔡司光学仪器(上海)国际贸易有限公司]; PL203 型电子天平[精度 0.1 mg, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; JJ500 型电子秤(精度 10 mg, 常熟市双杰测试仪器厂); DS-671 电子秤(精度 1 g, 上海寺冈电子有限公司); Airstream II 级 A2 型生物安全柜(新加坡艺思高科技有限公司); LRH-400A 生化培养箱(北京泰宏君仪器有限公司); TOMY SX-700 快速自动高压灭菌器[天美仪拓实验室设备(上海)有限公司]。

1.3 试验对象

SPF 级 ICR 小鼠(合格证号: 20220004024774), SPF 级 SD 大鼠(合格证号: 20220004024773), 均由上海斯莱克试验动物有限责任公司提供, 动物生产许可证号: SCXK(沪)2022-0004。动物饲养在屏障环境中, 环境设施使用许可证号: SYXK(苏)2022-0034, 环境温度: 20~24 °C, 相对湿度: 40%~70%, 12/12 h 昼夜明暗交替。试验期间大、小鼠自由饮用灭菌水、摄食灭菌维持饲料, 维持饲料来源及生产许可证号: 江苏省协同医药生物工程有限责任公司,

苏饲证(2019)01008。

1.4 试验方法

1.4.1 试验设计依据

γ -PGA 属于食品添加剂类别, 依据 GB 15193.1—2014 《食品安全国家标准 食品安全性毒理学评价程序》中“食品添加剂毒理学评价”的要求, 开展急性经口毒性试验、遗传毒性试验(包括细菌回复突变试验、小鼠骨髓细胞微核试验和小鼠精母细胞染色体畸变试验)毒理学安全性评价。

1.4.2 急性经口毒性试验(小鼠)

选用 SPF 级健康 ICR 小鼠 20 只, 雌雄各半, 初始体重 18~22 g。采用限量法, 设计剂量为 10000 mg/(kg · bw), 即称取 γ -PGA 10000 mg, 加纯水定容至 40 mL 作为受试物。小鼠禁食 6 h 后, 将受试物分两次灌胃给予, 每次灌胃容量均为 20 mL/(kg · bw), 时间间隔 4 h, 灌胃后 2 h 给食, 试验期间均不限制饮水, 观察期 14 d, 记录小鼠中毒表现及死亡情况。

1.4.3 急性经口毒性试验(大鼠)

选用 SPF 级健康 SD 大鼠 20 只, 雌雄各半, 初始体重 180~220 g。采用限量法, 设计剂量为 10000 mg/(kg · bw), 即称取 γ -PGA 30000 mg, 加纯水定容至 120 mL 作为受试物。大鼠禁食过夜后, 将受试物分两次灌胃给予, 每次灌胃容量均为 20 mL/(kg · bw), 时间间隔 4 h, 灌胃后 4 h 给食, 试验期间均不限制饮水, 观察期 14 d, 记录大鼠中毒表现及死亡情况。

1.4.4 小鼠骨髓细胞微核试验

选用 SPF 级健康 ICR 小鼠 50 只, 雌雄各半, 初始体重 25~30 g。将小鼠分性别按体重随机分入 3 个样品剂量组[5000、2500、1250 mg/(kg · bw)]、1 个溶剂对照组(纯水)和 1 个阳性对照组[环磷酰胺, 40 mg/(kg · bw)], 每组 10 只, 雌雄各半。采用 30 h 两次灌胃法, 灌胃间隔时间 24 h, 每次灌胃容量均为 20 mL/(kg · bw), 第二次灌胃后 6 h 取小鼠股骨骨髓悬于小牛血清中直接涂片, 经甲醇固定、Giemsa 液染色后, 每只动物镜检嗜多染红细胞(polychromatic erythrocyte, PCE) 2000 个, 计数含微核的 PCE 数。每只动物观察 200 个 PCE 的同时计数所见到的正染红细胞(normochromatic erythrocyte, NCE)数, 计算 PCE 数在总红细胞(PCE+NCE)数中的比例。

1.4.5 细菌回复突变试验

设 5 个样品剂量组, 称取 γ -PGA 500 mg 用纯水定容至 10 mL, 经 121 °C、20 min 高压灭菌作为最高剂量组受试物(5000 μ g/mL)。无菌环境条件下准确量取最高剂量组受试物, 用灭菌纯水依次连续作 5 倍稀释配成其他剂量组受试液(1000、200、40、8 μ g/mL)。试验另设 2 个溶剂对照组(灭菌纯水和二甲基亚砜)、1 个未处理对照即自发回变组、1 个阳性对照组(阳性对照物敌克松、2-氨基芴和 1,8-二羟基蒽醌溶剂为二甲基亚砜, 叠氮钠和环磷酰胺溶剂为灭菌纯水)。

采用平板掺入法进行试验, 每个测试点各设 3 个平行样。在 2 mL 顶层培养基中依次加入 0.1 mL 试验菌株增菌液, 0.1 mL 受试物溶液(或溶剂、阳性对照物, 未处理对照组不加), 需要代谢活化时另加入 S₉混合液 0.5 mL, 混匀后倒入底层培养基平板上, 培养基凝固后倒置于 37 °C 培养箱中孵育 48 h, 计数每皿中的回变菌落数。重复该试验 1 次, 除剂量间距不同外(5000.0、1250.0、312.5、78.1、19.5 μ g/mL), 试验方法同上。

1.4.6 小鼠精母细胞染色体畸变试验

选用 SPF 级健康雄性 ICR 小鼠 25 只, 初始体重 29~35 g。小鼠按体重随机分入 3 个样品剂量组[5000、2500、1250 mg/(kg · bw)]、1 个溶剂对照组(纯水)和 1 个阳性对照组[丝裂霉素 C, 2 mg/(kg · bw)], 每组 5 只。样品各剂量组、溶剂对照组动物均连续灌胃 5 d, 每天 1 次, 每次灌胃容量均为 20 mL/(kg · bw); 阳性对照组动物仅于试验第 1 d 腹腔注射 1 次, 注射量为 10 mL/(kg · bw)。试验第 14 d, 各组动物均于处死前 4 h 腹腔注射秋水仙素[5 mg/(kg · bw)], 注射量为 10 mL/(kg · bw)。颈椎脱臼法处死小鼠, 取两侧睾丸, 去净脂肪, 撕开被膜, 分离曲细精管, 1%柠檬酸三钠低渗处理, 甲醇:冰乙酸(V:V=3:1)固定液固定两次, 800 r/min 离心 5 min 后使用 60%冰乙酸软化, 1000 r/min 离心 10 min 后进行滴片, Giemsa 液染色, 阅片。

1.5 数据处理

本研究中试验数据以平均数±标准偏差表示, 利用 IBM SPSS Statistics 23.0 standard 网络版进行统计分析, 采用卡方检验对微核试验及染色体畸变试验中计数资料进行组间差异比较, $P<0.05$ 表示有统计学意义, $P<0.01$ 表示具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 小鼠急性经口毒性试验结果

γ -PGA 对小鼠体重的影响及急性经口毒性观察情况分别见表 1、表 2。经口给予小鼠 γ -PGA 后, 未见明显中毒表现, 对其体重增长也无明显影响, 整个观察期内未发生动物死亡。至观察期结束时, 对小鼠大体解剖检查同样未见明显异常。本次试验中, γ -PGA 对雌雄小鼠 MTD 值均大于 10000 mg/(kg · bw), 其半数致死剂量(median lethal dose, LD₅₀)大于该数值, 根据急性经口毒性分级标准, γ -PGA 属实际无毒级。

表 1 γ -PGA 对小鼠体重的影响
Table 1 Effects of γ -PGA on the body weight of mice

性别	动物数/只	初始体重/g	一周体重/g	二周体重/g
雌	10	20.2±0.7	25.1±1.1	28.6±1.3
雄	10	20.9±1.0	28.1±1.3	33.9±1.5

表 2 小鼠急性经口毒性试验结果
Table 2 Results of acute oral toxicity test in mice

性别	剂量 /[mg/(kg·bw)]	动物数 /只	出现中毒表 现动物数/只	MTD /[mg/(kg·bw)]
雌	10000	10	0	>10000
雄	10000	10	0	>10000

注：急性经口最大耐受剂量(maximum tolerated dose, MTD)。

2.2 大鼠急性经口毒性试验结果

γ -PGA 对大鼠体重的影响及急性经口毒性观察情况分别见表 3、表 4。大鼠灌胃约 3 h 后出现腹泻、粪便不成形等中毒表现, 约 1 d 后症状相继缓解, 整个观察期内未出现大鼠死亡的情况, 对其体重增长也无明显影响。至观察期结束时, 对大鼠大体解剖检查同样未见明显异常。本研究中, γ -PGA 对雌雄大鼠急性经口 MTD 值均大于 10000 mg/(kg·bw), 其 LD₅₀ 大于该数值, 根据急性经口毒性分级标准, γ -PGA 属实际无毒级。

表 3 γ -PGA 对大鼠体重的影响
Table 3 Effects of γ -PGA on the body weight of rat

性别	动物数/只	初始体重/g	一周体重/g	二周体重/g
雌	10	191±6	225±8	257±12
雄	10	202±13	258±20	316±29

表 4 大鼠急性经口毒性试验结果
Table 4 Results of acute oral toxicity test in rat

性别	剂量 /[mg/(kg·bw)]	动物数 /只	出现中毒表 现动物数/只	MTD /[mg/(kg·bw)]
雌	10000	10	10	>10000
雄	10000	10	10	>10000

2.3 小鼠骨髓细胞微核试验结果

PCE 数与总红细胞(PCE+NCE)数的比值是评估化合

物细胞毒性的重要指标。在本研究中, γ -PGA 各剂量组 PCE 数与总红细胞数的比值与溶剂对照组相比均未呈现统计学差异($P>0.05$), 提示骨髓红细胞增殖并无明显受抑^[20], 即 γ -PGA 无细胞毒性, 因此对含微核的 PCE 观察无明显影响^[21]。含微核 PCE 率是微核试验中评价化合物对哺乳动物体细胞染色体损伤程度的关键指标。研究结果显示, 阳性对照组含微核 PCE 率与溶剂对照组相比具有显著性差异($P<0.01$), 而 γ -PGA 各剂量组的含微核 PCE 率与溶剂对照组相比, 差异均无统计学意义($P>0.05$), 也无剂量-反应关系。因此, γ -PGA 对小鼠骨髓红细胞无致微核作用, 结果见表 5。

2.4 细菌回复突变试验结果

回变菌落数是细菌回复突变试验中评价化合物诱导基因突变活性的关键指标, 其数值变化可以反映化合物对测试菌株 DNA 的致突变潜能。在本研究中, 两次试验结果显示, 阳性对照组(加或不加 S₉)回变菌落数均高于相应自发回变组的 2 倍, 自发回变组和 2 个溶剂对照组(加或不加 S₉)回变菌落数均在本实验室历史正常值范围内。 γ -PGA 各剂量组背景菌苔生长良好, 提示无明显细菌毒性, 其回变菌落数均未超过相应自发回变组值的 2 倍, 且无剂量-反应关系, 说明在有无 S₉ 代谢活化条件下, γ -PGA 对这 5 种菌株均未呈现诱变活性, 结果见表 6、表 7。

2.5 小鼠精母细胞染色体畸变试验结果

小鼠精母细胞染色体畸变率是评价化合物对雄性生殖细胞致突变能力的重要指标。本研究结果显示, γ -PGA 各剂量组染色体畸变细胞率与溶剂对照组相比, 差异均无统计学意义($P>0.05$), 也无剂量-反应关系, 阳性对照组与溶剂对照组比较, 染色体畸变细胞率、性染色体和常染色体单价体差异均具有统计学意义($P<0.01$), 说明 γ -PGA 对小鼠精母细胞染色体畸变结果为阴性, 结果见表 8。

表 5 小鼠骨髓红细胞微核试验结果
Table 5 Micronucleus test results of bone marrow erythrocytes in mice

性别	组别	剂量 /[mg/(kg·bw)]	动物数 /只	PCE 数 /个	含微核 PCE 数/个	PCE/(PCE+NCE) /%	含微核 PCE 率 /%
雌性	溶剂对照	0	5	10000	18	50.0±1.5	1.8±0.6
	低剂量组	1250	5	10000	15	50.3±1.3	1.5±0.7
	中剂量组	2500	5	10000	19	50.1±1.7	1.9±0.7
	高剂量组	5000	5	10000	15	50.8±1.1	1.5±0.8
	阳性对照	40	5	10000	266	49.4±1.3	26.6±6.2*
雄性	溶剂对照	0	5	10000	17	50.1±1.1	1.7±0.4
	低剂量组	1250	5	10000	14	49.8±1.8	1.4±0.4
	中剂量组	2500	5	10000	17	50.1±1.6	1.7±1.0
	高剂量组	5000	5	10000	16	50.2±1.1	1.6±0.4
	阳性对照	40	5	10000	257	49.7±1.0	25.7±3.7*

注: *表示与溶剂对照组相比, 具有显著性差异($P<0.01$)。表 8 同。

表 6 第一次细菌回复突变试验结果($n=3$)
Table 6 Results of the first bacterial reverse mutation test ($n=3$)

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	TA97a		TA98		TA100		TA102		TA1535	
		+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉
自发回变	/	105±15	101±6	36±1	32±2	83±10	102±6	311±7	265±17	21±4	15±3
二甲基亚砷	/	105±11	99±13	33±4	31±2	87±7	102±15	313±6	263±8	20±3	17±3
纯水	/	106±9	97±7	34±5	31±4	88±9	99±8	314±6	271±13	21±4	16±4
γ -PGA	8	101±4	92±13	33±2	29±1	89±5	101±4	294±20	267±7	19±3	18±2
	40	98±11	93±14	37±5	33±6	84±8	97±14	317±4	269±3	19±4	16±3
	200	103±11	92±8	33±2	31±1	92±13	108±8	313±8	271±5	20±5	17±4
	1000	104±10	94±14	36±1	34±2	89±8	106±4	304±12	276±13	19±3	18±3
	5000	106±16	93±14	32±4	29±1	90±11	99±7	313±8	268±15	21±5	16±4
敌克松	50	/	1232±87*	/	1270±131*	/	/	/	1261±113*	/	/
叠氮钠	1.5	/	/	/	/	/	1038±90*	/	/	/	414±97*
2-氨基苄	10	1340±109*	/	1075±91*	/	1372±74*	/	/	/	/	/
1,8-二羟基蒽醌	50	/	/	/	/	/	/	857±91*	/	/	/
环磷酰胺	20	/	/	/	/	/	/	/	/	215±35*	/

注: *表示回变菌落数达到相应自发回变组数值 2 倍。+S₉ 和 -S₉ 分别指有和无代谢活化系统参与。/表示无具体数据。表 7 同。

表 7 第二次细菌回复突变试验结果($n=3$)
Table 7 Results of the second bacterial reverse mutation test ($n=3$)

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	TA97a		TA98		TA100		TA102		TA1535	
		+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉
自发回变	/	103±13	101±5	34±3	32±4	83±8	104±2	309±12	270±11	20±4	19±5
二甲基亚砷	/	99±7	96±6	33±5	31±3	89±5	97±6	306±22	269±17	19±2	17±4
纯水	/	97±7	92±7	34±1	31±2	79±10	90±12	312±14	288±15	17±3	16±2
γ -PGA	19.5	103±2	95±12	33±3	32±4	81±12	99±11	312±10	270±9	21±4	16±3
	78.1	104±13	96±9	35±4	33±3	88±3	98±12	312±7	265±10	20±5	18±3
	312.5	94±11	87±10	31±5	30±2	87±11	101±7	307±17	269±10	21±4	19±5
	1250	101±11	90±5	35±3	31±2	92±3	103±8	310±8	265±12	19±5	17±1
	5000	96±13	97±9	33±2	32±1	84±3	101±9	311±12	268±14	20±3	17±4
敌克松	50	/	1276±131*	/	1263±107*	/	/	/	1228±42*	/	/
叠氮钠	1.5	/	/	/	/	/	1071±129*	/	/	/	443±93*
2-氨基苄	10	1284±45*	/	1098±44*	/	1397±90*	/	/	/	/	/
1,8-二羟基蒽醌	50	/	/	/	/	/	/	802±97*	/	/	/
环磷酰胺	20	/	/	/	/	/	/	/	/	177±38*	/

表 8 小鼠精母细胞染色体畸变试验结果
Table 8 Result of chromosome aberration test in mice spermatocytes

组别	剂量 ($\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{bw})$)	动物数 /只	观察 细胞数/个	裂隙/个	性染色体 单价体/%	常染色体 单价体/%	染色体畸变类型			畸变 细胞数/个	畸变 细胞率/%
							断片/个	易位/个	微小体/个		
阴性对照	0	5	500	0	3.2±1.3	1.6±1.1	3	0	0	3	0.6±0.9
低剂量组	1250	5	500	1	3.4±1.1	1.6±1.5	2	0	0	2	0.4±0.5
中剂量组	2500	5	500	0	3.2±1.9	1.6±0.9	2	0	2	4	0.8±0.8
高剂量组	5000	5	500	0	3.0±1.6	1.4±1.1	2	0	0	2	0.4±0.5
阳性对照	2	5	500	7	8.2±1.9*	6.0±1.6*	44	0	4	47	9.4±2.1*

3 讨论与结论

γ -PGA 在食品领域的应用日益广泛,但在其安全性评价方面,特别是 2014 版《食品安全国家标准》实施之后,国内外现有的研究资料仍显得相对不足。鉴于此背景,本研究深入研究了 γ -PGA 的急性毒性和遗传毒性。

在急性经口毒性试验中, γ -PGA 对雌雄小鼠、大鼠的 MTD 值均大于 10000 mg/(kg·bw),表明在急性经口暴露条件下, γ -PGA 对小鼠和大鼠毒性极低,按照急性经口毒性分级标准, γ -PGA 属于实际无毒级。本次研究中,虽然大鼠在灌胃后出现了短暂的腹泻和粪便不成形等中毒表现,但这些症状在 1 d 后即自行缓解,短期内未对大鼠的体重增长和生存造成显著影响。

本研究采用细菌回复突变试验、小鼠骨髓细胞微核试验以及小鼠精母细胞染色体畸变试验的方法组合,全面评估 γ -PGA 遗传毒性^[22-25]。其中,细菌回复突变试验是利用组氨酸缺陷型的鼠伤寒沙门氏菌,检测受试物是否具有直接或间接致突变性^[26-27]。在本研究中采用推荐的 5000 μ g/皿作为最高剂量,首次试验剂量间距设计为 5 倍,试验数据显示,在加及不加 S_9 代谢活化条件下, γ -PGA 对标准测试菌株均未表现出明显的诱变活性。有文献指出^[28],过大的剂量间距设计可能会漏检一些弱致突变物,因此在第二次试验中缩小剂量间距至 4 倍,再次验证了该阴性结果。小鼠骨髓红细胞微核试验和小鼠精母细胞染色体畸变试验是评价外源化学物对染色体损伤的两种经典方法^[29-33]。在本研究中,参考前期急性经口毒性试验结果,即无法得出具体 LD₅₀ 时,根据最大灌胃剂量[最大使用质量浓度 250 mg/mL 和最大灌胃容量 20 mL/(kg·bw)]设计了这两个试验的高剂量组,即 5000 mg/(kg·bw)。试验结果显示, γ -PGA 在试验剂量下未引起小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率的增加 ($P>0.05$),也未引起小鼠初级精母细胞染色体畸变率的上升 ($P>0.05$)。以上这些检测结果共同支持了 γ -PGA 无遗传毒性的结论。

综上所述,在本研究条件下, γ -PGA 安全、无毒且不具有遗传毒性,但为了更全面地评估其在食品领域的应用潜力,仍需考虑其潜在的长期毒性风险,当进一步研究其长期暴露下的安全性。

参考文献

- [1] 李华,胡丽娜,焦磊. γ -聚谷氨酸的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2024, 52(1): 84-90.
- [2] LI H, HU LN, JIAO L. Research progress of poly- γ -glutamic acid [J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2024, 52(1): 84-90.
- [3] LI M, ZHANG Z, LI S, *et al.* Study on the mechanism of production of γ -PGA and nattokinase in *Bacillus subtilis natto* based on RNA-seq analysis [J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20: 1-15.
- [4] CAO M, FENG J, SIRISANSANEYAKUL S, *et al.* Genetic and metabolic engineering for microbial production of poly- γ -glutamic acid [J]. Biotechnology Advances, 2018, 36(5): 1424-1433.
- [5] 吴泽,王刚,关统伟,等. γ -聚谷氨酸应用研究进展[J]. 现代农业科技, 2023(2): 188-193.
- [6] WU Z, WANG G, GUAN TW, *et al.* Research progress in application of γ -polyglutamic acid [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2023(2): 188-193.
- [7] 符恒,孙良,姜康,等. γ -聚谷氨酸的生物活性研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(3): 333-341.
- [8] FU H, SUN L, JIANG K, *et al.* Research progress on biological activities of poly- γ -glutamic acid [J]. China Food Additives, 2023, 34(3): 333-341.
- [9] 何宇,吕卫光,张娟琴,等. γ -聚谷氨酸的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(18): 18-22.
- [10] HE Y, LV WG, ZHANG JQ, *et al.* Research progress of γ -polyglutamic acid [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2020, 48(18): 18-22.
- [11] GOMAAE Z. Cryoprotection of probiotic bacteria with poly- γ -glutamic acid produced by *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* [J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2016, 14(2): 269-279.
- [12] 王慧,何宜能,张伟杰,等. γ -聚谷氨酸在冷冻食品中的应用及其抗冻机理的研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(5): 266-274.
- [13] WANG H, HE YN, ZHANG WJ, *et al.* A review of the application and antifreeze mechanism of γ -polyglutamic acid in frozen foods [J]. Food Science, 2023, 44(5): 266-274.
- [14] 彭敏,张迎庆,王婷,等. 聚谷氨酸对食品的功能性影响研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(7): 138-143.
- [15] PENG M, ZHANG YQ, WANG T, *et al.* Research progress of polyglutamic acid on functional foods [J]. China Food Additives, 2021, 32(7): 138-143.
- [16] TANIMOTO H, FOX T, EAGLES J, *et al.* Acute effect of poly- γ -glutamic acid on calcium absorption in post-menopausal women [J]. Journal of the American College Nutrition, 2007, 26(6): 645-649.
- [17] YANG LC, WU JB, HO GH, *et al.* Effects of poly- γ -glutamic acid on calcium absorption in rats [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2008, 72(12): 3084-3090.
- [18] TAMURA M, WATANABE J, HORI S, *et al.* Effects of a high- γ -polyglutamic acid containing natto diet on liver lipids and cecal microbiota of adult female mice [J]. Bioscience of Microbiota Food and Health, 2021, 40(4): 176-185.
- [19] LEE NR, LEE SM, CHO KS, *et al.* Improved production of poly- γ -glutamic acid by *Bacillus subtilis* D7 isolated from doenjang, a Korean traditional fermented food, and its antioxidant activity [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 173(4): 918-932.
- [20] TAMURA M, HOSHI C, KIMURA Y, *et al.* Effects of γ -polyglutamic acid on the cecal microbiota and visceral fat in KK-A^y/TaJcl male mice [J]. Food Science and Technology Research, 2018, 24(1): 151-157.
- [21] LI Y, ZHANG WJ, TANG C, *et al.* Antidiabetic effects and mechanism of γ -polyglutamic acid on type II diabetes mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 261(1): 129809.
- [22] TAMURA M, HORI S, INOSE A, *et al.* Effects of γ -polyglutamic acid on blood glucose and caecal short chain fatty acids in adult male mice [J]. Food and Nutrition Science, 2020, 11(1): 8-22.
- [23] PARK JH, CHOI JC, SUNG MH, *et al.* High molecular weight

- poly- γ -glutamic acid regulates lipid metabolism in rats fed a high-fat diet and humans [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 21(7): 766–775.
- [18] 张彩霞, 马立保, 冀志霞, 等. γ -聚谷氨酸的安全性评价(一)[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(17): 5816–5821.
- ZHANG CX, MA LB, JI ZX, *et al.* Safety evaluation of γ -polyglutamic acid(1) [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2019, 10(17): 5816–5821.
- [19] 武新月, 赵悦, 施伟庆, 等. 甜叶菊苷 M 的毒理学安全性评价[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(3): 250–258.
- WU XY, ZHAO Y, SHI WQ, *et al.* Toxicological safety evaluation of stevioside M [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(3): 250–258.
- [20] 王浚洋, 薛超, 张少岩, 等. 罗汉参的食用安全性评估[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(19): 306–313.
- WANG JZ, XUE C, ZHANG SY, *et al.* Edible safety evaluation of *Apiosfortunei maxim* [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 15(19): 306–313.
- [21] 王成章, 叶建中, 原姣姣, 等. 银杏叶聚戊烯醇急性毒性和遗传性毒理学研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2015, 27(7): 1259–1265.
- WANG CZ, YE JZ, YUAN JJ, *et al.* Estimation of acute and genetic toxicity of polyprenols from *Ginkgo biloba* L [J]. *Natural Product Research and Development*, 2015, 27(7): 1259–1265.
- [22] 陈耿, 鹿奎奎, 刘协, 等. 复方芦荟口服液的毒理学安全性与通便功效研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(11): 3575–3584.
- CHEN G, LU KK, LIU X, *et al.* Study on toxicological safety and embellish aperient bowel function of compound *Aloe vera* oral liquid [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2022, 13(11): 3575–3584.
- [23] 陈耿, 徐以泓, 谷艳杰, 等. 以阿拉伯树胶为原料的 L-阿拉伯糖的急性毒性和遗传毒性研究[J]. *江苏预防医学*, 2022, 33(3): 284–287, 293.
- CHEN G, XU YH, GU YJ, *et al.* Studies on acute toxicity and genotoxicity caused by L-arabinose originated from gumarabic [J]. *Jiangsu Journal of Preventive Medicine*, 2022, 33(3): 284–287, 293.
- [24] 陈耿, 陈东亚, 刘协, 等. 复方刺五加片毒理学安全性及缓解体力疲劳功效研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(14): 4724–4733.
- CHEN G, CHEN DY, LIU X, *et al.* Study on toxicological safety and alleviating physical fatigue function of compound *Acanthopanax senticosus* tablets [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2022, 13(14): 4724–4733.
- [25] 马红. 自组方 1 号的毒理学安全性评价[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2011, 13(5): 15–18.
- MA H. Toxicology and safety assessment of chinese herbal formula I [J]. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, 2011, 13(5): 15–18.
- [26] MORTELMANS K, ZEIGER E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay [J]. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2000, 455(1/2): 29–60.
- [27] 李志坤, 刘瑞, 李秀慧, 等. 乳钙咀嚼片细菌回复突变试验研究[J]. *食品与药品*, 2024, 26(4): 338–342.
- LI ZH, LIU R, LI XH, *et al.* Study on bacterial reverse mutation test of milk calcium chewable tablets [J]. *Food and Drug*, 2024, 26(4): 338–342.
- [28] 赵悦, 武新月, 俞萍. 染发类产品 Ames 试验中不同剂量下细菌毒性和培养时间的探讨[J]. *江苏预防医学*, 2020, 31(5): 482–484, 488.
- ZHAO Y, WU XY, YU P. Exploration on bacterial toxicity and culture time under different doses in Ames test of hair dye products [J]. *Jiangsu Journal of Preventive Medicine*, 2020, 31(5): 482–484, 488.
- [29] LI XM, WANG LR, LI SQ, *et al.* Evaluation of genotoxicity and teratogenicity of phyllyrin [J]. *Toxicon*, 2024, 249(10): 108080.
- [30] 赵俊鹏, 王玉君, 李欣颖, 等. 真核细胞微核及染色体畸变检测技术概况[J]. *中国工业医学杂志*, 2019, 32(1): 37–40.
- ZHAO JP, WANG YJ, LI XY, *et al.* General situation of detection techniques for micronucleus and chromosome aberration in eukaryotic cells [J]. *Chinese Journal of Industrial Medicine*, 2019, 32(1): 37–40.
- [31] 吴俊, 吕中明, 俞萍, 等. 微囊化番茄红素的安全性评价研究[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(16): 185–188, 193.
- WU J, LV ZM, YU P, *et al.* Study on toxicological security of lycopene microcapsule [J]. *Food Research and Development*, 2017, 38(16): 185–188, 193.
- [32] 张佳, 杨静. 葡萄籽-菊花-三七复合物的急毒、遗传毒性及长期毒性研究[J]. *化学试剂*, 2022, 44(7): 1028–1035.
- YANG J, YANG J. Study on acute, genetic and long-term toxicities of grape seed-chrysanthemum-panax *Notoginseng* complex [J]. *Chemical Reagents*, 2022, 44(7): 1028–1035.
- [33] 楼敏涵, 曲雪峰, 张丽婧, 等. 新食品原料食叶草的安全性评估[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(10): 3919–3926.
- LOU MH, QU XF, ZHANG LJ, *et al.* Safety evaluation of edible dock as a new food raw material [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(10): 3919–3926.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)