

实验技术与方法

微生物源酶制剂抗菌活性测定方法研究

韩小敏,李玉伟,张宏元,张靖,赵熙,韩春卉,李凤琴

(国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室,北京 100021)

摘要:目的 参考联合国粮农组织/世界卫生组织 (FAO/WHO) 食品添加剂联合专家委员会推荐的方法,在对包括纸片规格、培养基、标准菌株浓度、阳性对照物浓度等影响酶制剂抗菌活性检测主要因素优化的基础上,建立微生物源酶制剂抗菌活性检测方法。方法 以浓度为 5.0 和 10.0 $\mu\text{g}/\text{片}$ 的环丙沙星纸片为阳性对照,在相同的培养温度、培养时间等试验条件下,比较 9 种不同规格纸片、3 种品牌培养基、3 个菌液稀释度对 6 种标准菌株抗菌活性的影响。结果 HZT 2 号滤纸、2 张叠加的 whatman903 纸片与商业化抗菌活性测定用纸片 Whatman 2017-013 效果相当;国产 1 号和 2 号胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA) 与进口 TSA 效果相当;确定 5 种受试菌培养 24 h 后菌液的 10 倍稀释液为工作浓度 (化脓链球菌的工作浓度为菌液的 20 倍稀释液);环丙沙星纸片的工作浓度为 5.0 $\mu\text{g}/\text{片}$ 。结论 HZT 2 号滤纸、2 张叠加的 Whatman903 滤纸或 Whatman 2017-013 滤纸、国产或进口 TSA 培养基、受试微生物培养 24 h 的 10 倍 (化脓链球菌 20 倍) 菌液稀释液、环丙沙星浓度 5.0 $\mu\text{g}/\text{片}$ 为微生物源酶制剂抗菌活性测定中优化出的最佳试验条件。

关键词:酶制剂;抗菌活性;抗菌素;微生物;滤纸片;影响因素

中图分类号:R977.3;TQ465.92 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)06-0515-05

Study on detection of antimicrobial activity of enzyme preparations derived from microorganisms

HAN Xiao-min, LI Yu-wei, ZHANG Hong-yuan, ZHANG Jing, ZHAO Xi, HAN Chun-hui, LI Feng-qin

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China

National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To develop an antimicrobial activity detection method of enzyme preparations derived from microorganism, the key factors including paper specification, medium, the concentration of microorganisms as well as positive control antibiotics were screened and examined, based on the method recommended by JECFA. **Methods** Taking 5.0 and 10.0 $\mu\text{g}/\text{piece}$ of ciprofloxacin as positive control, nine kinds of paper, three kinds of medium and three bacteria concentrations under the same conditions (temperature, incubation time, etc) were checked for their influence on antimicrobial activity. **Results** The effect of HZT No. 2 and Whatman 903 (2 piece superposed) were comparable with the commercialized antimicrobial determining paper. The effect of tryptone soy agar (TSA) domestically produced (defined as No. 1 and No. 2) were comparable with imported TSA. The appropriate dilution of tryptone soy broth to 24 h cultures was 10 : 1 for 5 reference stains, and 20 : 1 for *Streptococcus pyogenes*. The recommended concentration for ciprofloxacin antimicrobial activity test was 5.0 $\mu\text{g}/\text{piece}$. **Conclusion** Paper HZT No. 2 or Whatman903 (2 piece superposed) or whatman 2017-013, domestic or imported TSA medium, 10 times culture dilution (20 times for *Streptococcus pyogenes*), and 5.0 $\mu\text{g}/\text{piece}$ ciprofloxacin were recommended in the determination of antimicrobial activity of enzyme preparations derived from microorganism.

Key words: Enzyme preparations; antimicrobial activity; antibiotics; microbe; filter paper; effect factors

食品用酶制剂是由微生物生产的高效生物活性物质,广泛用于淀粉、乳品、果汁加工及啤酒发酵等食品加工业。我国 GB 2760—2011《食品安全国

家标准 食品添加剂使用标准》附录 C 表 3 中列出了 52 种食品用酶制剂,其中微生物来源的有 44 种,占所列酶制剂总数的 83%^[1]。生产酶制剂的菌种一般情况下是无害的,但相同菌种中的某些菌株在长期筛选过程中会发生非产毒菌株自发性突变或基因漂移变为产毒株^[2],导致菌株在产生大量目的化合物的同时,也产生一些有毒代谢产物或有抗菌活性的生物活性物质。为保证微生物源酶制剂终产品中不含抗菌活性物质,确保产品的稳定性和安全

收稿日期:2013-08-26

基金项目:卫生部标准修订项目 (spaq-2011-60)

作者简介:韩小敏 女 博士 研究方向为食品微生物

E-mail:hanxiaomin@cfsa.net.cn

通讯作者:李凤琴 女 研究员 研究方向为食品微生物

E-mail:lifengqin@cfsa.net.cn

性,世界上许多国家规定微生物源酶制剂不得含有抗菌活性^[3-4]。

虽然我国 GB 25594—2010《食品安全国家标准食品工业用酶制剂》^[5]中规定微生物源酶制剂中不得检出抗菌活性物质,但我国尚未建立微生物源酶制剂中抗菌活性物质的标准检测方法;《美国食品药品监督管理局(FDA)酶制剂通用准则》^[2]中规定,来源于微生物的酶制剂中不得含有抗生素、毒素(肠毒素、真菌毒素等),如可能含有不确定的毒素或抗生素,必须用适当的检测方法进行检测,并证明确实不存在具有生物学意义水平的毒素或抗生素,但该准则未提供合适的检测方法;国际食品添加剂联合专家委员会(JECFA)编著的《食品添加剂规范纲要第1卷附录A》^[6]提供了较详细的抗菌活性检测方法,包括测定用微生物、培养基、纸片、酶制剂稀释比例、微生物培养时间等。由于考虑到国内外的培养基、纸片在成分、工艺等方面存在一定的差异,因此国内常规实验材料是否能达到国外培养条件下相同的效果有待验证。本研究在对包括纸片规格、培养基种类、受试微生物菌液稀释比例等影响抗菌活性测定关键因素优化的基础上,建立一种适合我国微生物源酶制剂抗菌活性测定的标准操作方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 标准菌株

根据 JECFA 食品添加剂规范纲要第1卷中的推荐,本试验选择金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538,大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) ATCC 11229,蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) ATCC 2,环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*) ATCC 4516,化脓链球菌(*Streptococcus pyrogenes*) ATCC 12344,粘质沙雷菌(*Serratia marcescens*) ATCC 14041 共6株标准菌株为试验用菌。以上菌株均购自中国食品发酵工业研究院。

1.1.2 纸片

收集市面上销售的9种纸片和商业化抗菌活性测定用纸片 Whatman 2017-013,所有纸片编号及规格,见表1。9种纸片人工制成直径13 mm的纸片,121 °C 高压灭菌20 min 后备用。

1.1.3 仪器与试剂

生化培养箱、生物安全柜、一次性无菌培养皿、玻璃试管(12 cm × 5 cm)、移液器、比浊计。

胰蛋白胍大豆琼脂(TSA),分别为进口、国产1号、国产2号,胰蛋白胍大豆肉汤(TSB,进口)。

表1 纸片的编号及规格

滤纸编号	厚度/mm	滤纸编号	厚度/mm
HZXM	0.30 ± 0.05	HZT 1号	0.75 ± 0.05
HZXH	0.70 ± 0.05	HZT 2号	0.75 ± 0.05
SZKY	0.50 ± 0.05	HZCF 3号	0.50 ± 0.05
SZKX	0.80 ± 0.05	Whatman903	0.50 ± 0.05
ZJXD	0.75 ± 0.05	Whatman 2017-013	1.00 ± 0.05

环丙沙星标准品(纯度98%,美国Sigma公司)。酶制剂:淀粉酶2号、葡糖淀粉酶6号(均购自无锡杰能科生物工程有限公司),Catazyme 25L、Branchzyme(诺维信),Brewers cleares、Accelezyme(DSM)。

1.2 方 法

1.2.1 抗菌活性测定^[6]

菌悬液的制备:将6株标准菌株从相应冻存管中取出1~2环菌液,分别接种到含4~5 ml 胰蛋白胍大豆肉汤的试管中,置(37 ± 1) °C 恒温培养箱中培养24 h,再取出1~2环,分别接种到含4~5 ml 胰蛋白胍大豆肉汤的试管置(37 ± 1) °C 恒温培养箱中培养24 h 进行二次活化,菌液原液和 TSA 培养基按1:10 (V/V)的比例加入冷却至45~47 °C 的TSA,化脓链球菌 ATCC 12344 则按1:20 (V/V)的比例添加。

纸片的制备:分别吸取50.0或100.0 μg/ml 环丙沙星溶液100 μl,缓慢滴加于各种不同规格的无菌纸片上,制成含环丙沙星5.0或10.0 μg/片的纸片,待抗生素充分吸收后备用,同时用100 μl 无菌蒸馏水制备的纸片作为空白对照。

抗菌活性检测:取冷却至45~47 °C TSA 15 ml 倾入无菌培养皿,凝固后在TSA上再次倾注10 ml 已制备好的含菌液的TSA,待其凝固后将含环丙沙星的纸片置于其上,每皿放置4片。将上述平板置冰箱中过夜,使抗菌物质更好的扩散。过夜后转于37 °C 温箱中培养24 h 后测定抑菌圈的直径。

结果分析与判定:阳性结果在纸片周围出现透明清晰可见的抑菌环带,若环带总直径 ≥ 16 mm,说明待测样品中存在抗菌物质。若待测样品对3种或3种以上受试微生物存在明显的抑菌作用,则判定待测样品中含有抗菌物质,检测结果为阳性。

1.2.2 影响抗菌活性测定因素的优化

不同规格纸片对抗菌活性的影响:将不同种类纸片分别制成直径为13.0 mm 的圆形纸片,取100 μl 蒸馏水缓慢地滴加到每张纸片上,观察其吸收效果。同时将100 μl 酶制剂原液用蒸馏水制成10倍稀释溶液,吸取100 μl 缓慢地滴加到每张纸片上,观察其吸收效果。将能在较短时间(60 s)内充分吸收100 μl 蒸馏水的纸片认为是初筛合格的纸片。对初筛合格纸片按1.2.1方法进行抗菌活性测定。

分别制备5.0和10.0 μg/片的环丙沙星纸片用

于抗菌活性测定不同浓度环丙沙星对抗菌活性的影响,步骤同 1.2.1。验证不同品牌培养基对抗菌活性的影响,选择 3 种不同厂家生产的 TSA 培养基对抗菌活性测定,步骤同 1.2.1。将培养 24 h 的菌悬液系列稀释,分别制备 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 3 个稀释度并用于抗菌活性测定不同稀释度受试微生物培养液对抗菌活性的影响,步骤同 1.2.1。

1.2.3 方法应用

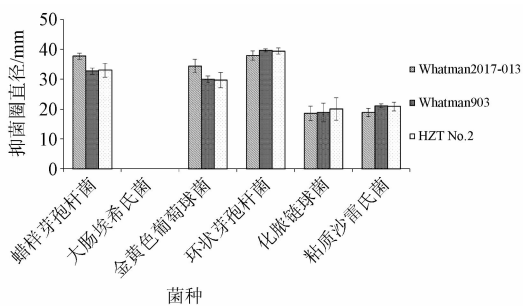
称取 1.0 g 酶制剂于 9 ml 无菌生理盐水中,若为液体样品则吸取 1 ml 酶制剂溶液至 9 ml 无菌生理盐水中,制成 10% 酶制剂溶液;将无菌纸片放入无菌平皿内,在每张纸片上缓慢滴加 100 μ l 10% 的酶制剂溶液使其浸透,每种酶制剂样品制备 12 张纸片。按照 1.2.1 步骤测定酶制剂抗菌活性。

同时用已知不含抗菌活性的酶制剂样品 10 倍稀释液做对照,分别取上述稀释液 9.5 ml,各加入 500 μ l 1 000.0 μ g/ml 的环丙沙星溶液,制成终浓度为 50.0 μ g/ml 的环丙沙星酶制剂溶液,取 100 μ l 缓慢滴加到纸片上按 1.2.1 方法测定抑菌活性进行加标回收试验。

2 结果

2.1 不同规格滤纸吸水性能比较

为获得可用于抗菌活性测定的纸片,对 9 种品牌滤纸的吸水性能进行分析,结果见表 2。SZKX、HZT 2 号与 Whatman 2017-013 的吸水效果相同,均能在较短时间内(60 s)全部吸收 100 μ l 蒸馏水。



注:左图为 5.0 μ g/片环丙沙星,右图为 10.0 μ g/片环丙沙星

图 1 3 种规格纸片对抗菌活性的影响

Figure 1 Effect of three types of paper on antimicrobial activities

2.2 环丙沙星浓度的选择

分别制备含环丙沙星 5.0 和 10.0 μ g/片的纸片,按照 1.2.1 的试验步骤进行抗菌活性测定,结果见图 2。两种抗生素浓度下均有 3 株以上细菌的抑菌圈直径 > 16.0 mm,检测结果均为阳性。但在实际操作过程中,环丙沙星浓度为 10.0 μ g/片时,形成的抑菌圈过大,难以对其抑菌圈进行准确的测量,因此后续研究中建议采用 5.0 μ g/片环丙沙星。

10 倍酶制剂稀释液测定结果与蒸馏水相同,此外 2 张叠加 Whatman 903 吸收效果与 Whatman 2017-013 相同。因 SZKX 纸片数量不足,后续试验中未用该纸片进行试验。

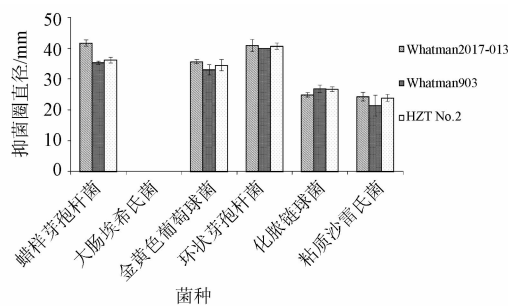
表 2 不同品牌纸片吸水效果分析

Table 2 Comparison of the water absorption efficiency by different brand paper

编号	品牌	100 μ l 蒸馏水	100 μ l 10 倍稀释酶制剂
1	HZXM	++	++
2	HZXH	+	+
3	SZKY	-	-
4	SZKX	+++	+++
5	ZJXD	-	-
6	HZT 1 号	++	++
7	HZT 2 号	+++	+++
8	HZCF 3 号	++	++
9	Whatman 903	+++	+++
10	Whatman 2017-013	+++	+++

注: - 表示不吸收; + 表示少量吸收; ++ 表示 50% 吸收; +++ 表示全部吸收

分别将 Whatman 2017-013、2 张叠加 Whatman 903、HZT 2 号制成含环丙沙星 5.0 和 10.0 μ g/片的纸片后进行抗菌活性测定,结果见图 1。用 3 种滤纸制备含环丙沙星 5.0 和 10.0 μ g/片纸片的抗菌活性差异无统计学意义,均能使 5 株细菌抑菌圈直径 > 16 mm,与 JECFA 规定 3 株与(或)3 株以上标准菌株抑菌圈直径 ≥ 16 mm 的判定结果相吻合。



2.3 不同品牌培养基对抗菌活性的影响

选择 1 种进口和 2 种国产 TSA (1 号和 2 号),将含环丙沙星 5.0 和 10.0 μ g/片的纸片置于不同厂家生产的 TSA 平板上进行抗菌活性测定,结果见图 3。5 株标准菌株在 3 种培养基上产生的抑菌圈直径均 > 16 mm,检测结果为阳性,证实本试验所采用的 2 种国产培养基与进口培养基相当,完全可以满足抗菌活性测定的要求。

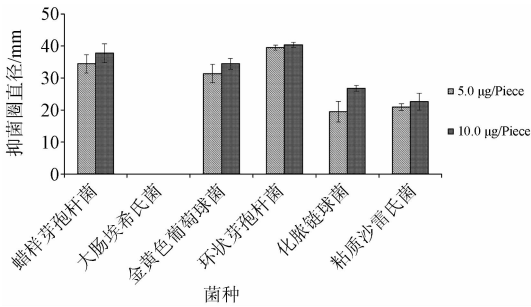
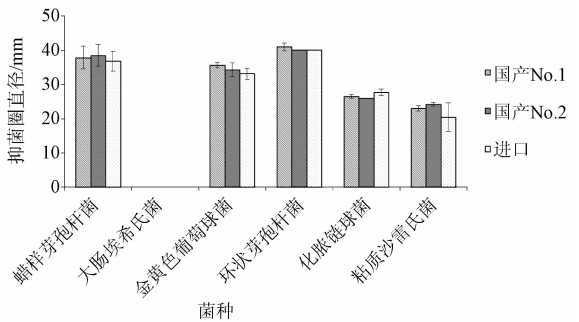
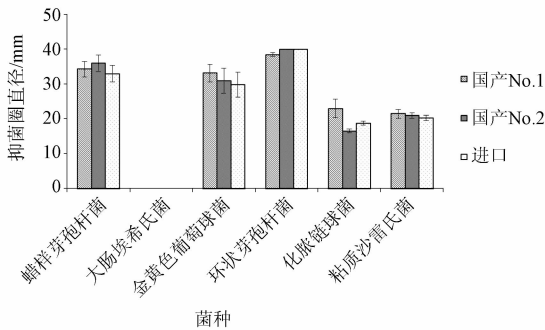


图2 不同浓度环丙沙星对抗菌活性的影响
Figure 2 Effect of different CIP concentration on antimicrobial activities

2.4 不同受试微生物培养物稀释度对抗菌活性的影响

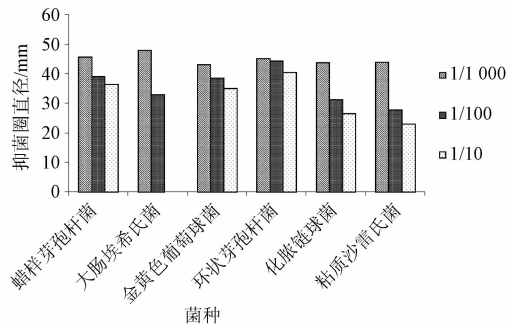
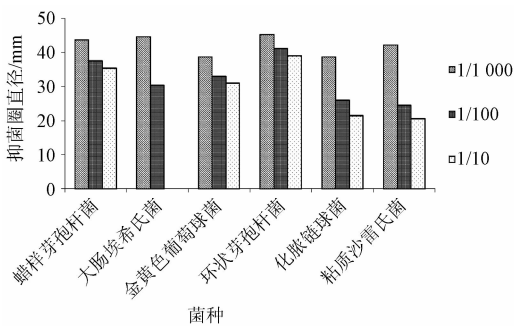
将金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、粘质沙雷菌、蜡样芽孢杆菌、环状芽孢杆菌在胰蛋白大豆液体培养基中培养 24 h 的菌悬液按 1:10 (V/V) 稀释、化脓链球菌按 1:20 (V/V) 稀释进行抗菌活性测定,在此基础上选择 1:10、1:100、1:1 000 (V/V) 三个不同稀释度对 6 株标准菌株的抗菌活性进行测定。同一菌株同一稀释度下测得抑菌圈取平均值并进行统计分析,结果见图 4。6 个标准菌株培养 24 h 后的菌液稀释度对抗菌活性试验结果的影响程度不同,但都呈现随菌悬液稀释度增加,抑菌圈逐渐增大的现象。



注:左图为5.0 µg/片环丙沙星,右图为10.0 µg/片环丙沙星

图3 不同品牌培养基对抗菌活性的影响

Figure 3 Effect of different brand of media on antimicrobial activities



注:左图为5.0 µg/片环丙沙星,右图为10.0 µg/片环丙沙星

图4 不同稀释度菌液对抗菌活性的影响

Figure 4 Effect of 24-hour cultures concentrations of different bacteria on antimicrobial activities

为了保证试验结果的稳定性,按照 GB 4789.2—2010 要求对 6 种受试微生物在胰蛋白大豆液体培养基培养 24 h 后的菌液浓度进行计数。结果依次为:大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和粘质沙雷菌的菌液原液浓度在 $10^8 \sim 10^9$ cfu/ml,蜡样芽孢杆菌和环状芽孢杆菌的菌液原液浓度在 $10^6 \sim 10^7$ cfu/ml,化脓链球菌的菌液原液浓度在 $10^7 \sim 10^8$ cfu/ml 范围内。考虑到菌液稀释度过大易造成假阳性现象,不能保证试验结果的可靠性及稳定性,因此建议金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、粘质沙雷菌、蜡样芽孢杆菌、环状芽孢杆菌 24 h 培养液按 1:10 (V/V) 稀释,化脓链球菌按 1:20 (V/V) 稀释后进行试

验,同时保证培养 24 h 菌液原液的计数结果在上述范围内。

2.5 酶制剂成分对抗菌活性的影响

从几种酶制剂中选择 Branchzyme、Brewers clears 两种酶制剂,用无菌生理盐水溶解并 10 倍稀释后加入环丙沙星,制成 5.0 µg/片的环丙沙星纸片,同时用无菌蒸馏水溶解的环丙沙星制作的纸片做对照进行抗菌活性测定,结果见图 5。添加环丙沙星后酶制剂的抗菌效果与相同浓度下纯环丙沙星溶液产生的抗菌效果相同,证明所建立的抗菌活性检测方法可靠,可用于检测酶制剂中的抗菌活性物质。

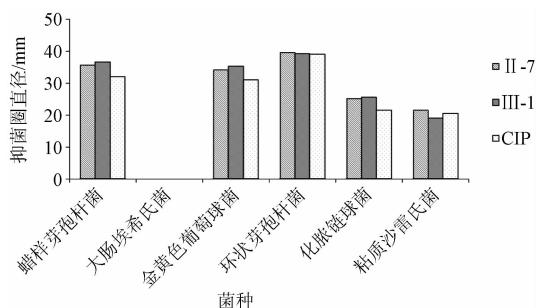


图5 酶制剂成分对抗菌活性的影响(5.0 $\mu\text{g}/\text{片}$)

Figure 5 Effect of ingredient of enzyme preparations spiked CIP

2.6 酶制剂抗菌活性的测定

选择不同厂家生产的淀粉酶2号、葡糖淀粉酶6号、Catzyme 25L、Branchzyme、Brewers cleares、Accelezyme共6种商品化酶制剂,用JECFA推荐的0.1 g/ml或0.1 ml/ml,用所建方法对其抗菌活性进行测定,结果6种酶制剂抗菌活性均为阴性。

3 讨论

3.1 纸片规格对抗菌活性的影响

厚度 $<0.3\text{ mm}$ 的薄型滤纸测定时样品中的抗生素不可能被均匀充分地吸收,导致试验结果的不确定性^[7]。为保证试验结果的可靠性,需要对测定用滤纸进行考察。在本试验中所选择的9种pH中性滤纸中HZT 2号、Whatman 903与Whatman 2017-013抗菌活性测定结果差异无统计学意义,3种纸片均可用作微生物源酶制剂抗菌活性测定。

3.2 菌液浓度与抗菌活性

在微生物的药敏试验中,合适的菌液浓度是得到正确结果的基本保证。菌液浓度过高,会出现在抗生素浓度固定的情况下,某些菌株不能被抑制的假阴性现象;相反,菌液浓度过低,则会出现在抗生素浓度固定的情况下,某些菌株被抑制的假阳性现象。研究证实,在抗生素浓度一定的情况下,菌液浓度越大则抑菌圈越小。本试验所选择的3个浓度中,100倍与1000倍稀释液与原菌液10倍稀释液抑菌圈测定结果差异有统计学意义,最大可引起16 mm以上的抑菌圈差异^[6, 8-9]。因此,在进行试验前,需对受试微生物浓度进行计数。

3.3 培养基种类与抗菌活性

培养基的配制、营养成分及杂质的种类等都可以影响药敏试验的结果。培养基中营养物质配比不同、浓度过高或融化不良以及平板厚薄不均等都可能影响药物扩散而影响药敏试验结果^[7]。试验表明,采用3种培养基测定的抑菌圈大小差别不大,检测结果均为阳性,仅在形成的抑菌圈的透明度上有微弱差别,国产1号和2号TSA以及进口TSA均可以满足抗菌活性测定的要求。

3.4 环丙沙星浓度与抗菌活性

抗生素浓度可明显影响抑菌圈直径,一般来说相同菌液浓度下,抗生素浓度越大,抑菌圈越大。本试验参考JECFA的抗菌活性测定方法,但该方法未提供阳性对照物(抗生素),本试验证实采用5.0和10.0 $\mu\text{g}/\text{片}$ 环丙沙星进行试验,结果均为阳性,可满足质量控制要求。

综上所述,微生物源酶制剂抗菌活性试验中,建议选择HZT 2号或Whatman 903或Whatman 2017-013纸片、5.0 $\mu\text{g}/\text{片}$ 环丙沙星、菌液原液10倍稀释液(化脓链球菌为20倍稀释液)、国产1号或2号或进口TSA或质量相当者进行试验。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. GB 2760—2011 食品安全国家标准食品添加剂使用标准[S]. 北京:中国标准出版社,2011.
- [2] FDA. Guidance for industry: enzyme preparations: recommendations for submission of chemical and technological data for food additive petitions and GRAS notices[S]. 2010.
- [3] 罗君毅,程池. 酶制剂抗菌活性检测标准菌株的药敏性分析[J]. 食品与发酵工业,2009(1):17-22.
- [4] 罗雪云. 部分国家及国际组织食品用酶制剂管理现状[J]. 中国食品卫生杂志,2003,15(3):1994.
- [5] 中华人民共和国卫生部. GB 25594—2010 食品安全国家标准食品工业用酶制剂[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [6] Committee F W E. Combined compendium of food additive specifications(Volume 4) [S]. Rome:2006.
- [7] 车凌云,张妮. 谈纸片扩散法细菌药敏试验的影响因素[J]. 内蒙古中医药,2011,30(22):7.
- [8] 孙长贵,张静华,黄景明,等. 扩散法药敏试验六种影响因素的实验评价及控制[J]. 临床检验杂志,1991,9(3):136-139.
- [9] 余修中. K-B法药敏试验中菌液量的规范[J]. 四川省卫生管理干部学院学报,2002,9(21):177-178.