

恩拉霉素微生物检定法的研究

陈敏¹, 金萍¹, 方中²

(1. 浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江杭州 310012; 2. 浙江凯胜科技有限公司, 浙江杭州 310014)

摘要:以枯草芽孢杆菌为检定菌, 检定培养基 I 号为试验用培养基, 采用双碟法进行恩拉霉素样品测定。通过浸提溶液组成、浸提时间、检定菌浓度考察, 优化了检定条件。在此基础上, 确立了恩拉霉素浓度的对数值与抑菌圈直径的线性范围, 并对所建立的微生物检定法进行准确度、最小检出限等考察。结果表明, 采用丙酮浸提液 B、浸提恩拉霉素样品 80 min, 恩拉霉素浸提较完全。在检定菌浓度 10^6 个/mL 的条件下, 恩拉霉素浓度在 0.56~35.79 U/mL 之间, 其浓度的对数值与相应的抑菌圈直径呈直线相关, 相关系数 r 为 0.9960。将建立的恩拉霉素微生物检定法用于恩拉霉素样品测定, 回收率为 95.90%, 相对标准偏差(RSD)为 1.95%。本方法可用于含恩拉霉素的样品测定。

关键词:恩拉霉素; 浸提; 效价测定; 微生物检定法

中图分类号: Q936

文献标识码: A

文章编号: 1671-7236(2012)01-0056-04

恩拉霉素(enramycin), 又名安来霉素、恩霉素、持久霉素, 系 1966 年自日本兵库县西宫市土壤中的链霉菌(*Streptomyces fungicidicus* No. B5477)所产生的抗生素(Higashide 等, 1968); 它是不饱和脂肪酸与十几种氨基酸结合的多肽类抗生素, 主要成分为恩拉霉素 A 和恩拉霉素 B, 还有少量的 C 和 D 组份(Iwasaki 等, 1973)。目前, 研究结果表明, 恩拉霉素 A 和恩拉霉素 B 的分子式分别为 $C_{107}H_{138}N_{26}O_{31}Cl_2$ 和 $C_{108}H_{140}N_{26}O_{31}Cl_2$, 易溶于稀盐酸、微溶于水、甲醇、乙醇, 不溶于丙酮; 其盐酸盐对热、光照和潮湿有极好的稳定性(周岷江等, 2007)。研究结果显示, 恩拉霉素在好氧和厌氧条件下对革兰氏阳性菌都有显著作用, 如对金黄色葡萄球菌, 溶血型链球菌, 炭疽杆菌、破伤风杆菌等有高效杀菌作用(仕金等, 2003)。恩拉霉素具有优良的促生长和改善饲料利用率的作用, 因此被世界上许多国家推荐作为畜禽抗生素促生长剂。

目前恩拉霉素的含量测定是按照农业部 1999 年颁发的《进口兽药质量标准》(中华人民共和国农业部)和 2008 年颁布的《饲料中恩拉霉素的测定、微生物学测定》(中华人民共和国国家标准)方法进行; 这 2 个标准都是按照国际上常用微生物检定法的管碟法进行恩拉霉素的测定。微生物检测法可靠性高、操作简单、费用低, 而且有较强的特异性(舒黛廉等, 2008), 因此是多组分抗生素检测最常用的方

法。试验在标准方法的基础上, 结合相关文献(唐靓等, 2005; 崔春英, 1994)对测定方法中的浸提液组成、浸提时间, 检定菌浓度进行比较优化, 采用一剂量法建立恩拉霉素抑菌圈直径与效价的线性方程, 以期更有效简便的用于恩拉霉素样品及发酵过程中恩拉霉素的测定。

1 材料与方法

1.1 试验材料 检定菌: 枯草芽孢杆菌(ATCC6633), 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。测试样品: 恩拉霉素预混剂(4%), 购自浙江某药业股份有限公司; 恩拉霉素标准品, 效价为 845.6 U/mg, 由浙江某科技有限公司提供; 甲醇、乙醇、丙酮、 KH_2PO_4 等试剂, 分析纯, 均购自杭州汇普化工仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 浸提溶液的配制 分别用水、甲醇溶液、乙醇溶液、丙酮溶液作为浸提溶液, 其配制方法如下。水浸提液配制: 用 1 mol/L 盐酸调至 pH 为 3.0。甲醇浸提液配制: 甲醇与水 1:1 混匀配制, 用 1 mol/L 盐酸调至 pH 为 3.0(顾欣等, 2008)。乙醇浸提液配制: 乙醇与水 3:1 混匀配制, 用 1 mol/L 盐酸调至 pH 为 3.0(杨文革等, 2009)。丙酮浸提液 A 配制: 丙酮: 1 mol/L 盐酸: 水 = 35:12:56, 用 1 mol/L 盐酸调至 pH 为 3.0(进口兽药质量标准, 1999)。丙酮浸提液 B 配制: 丙酮: 2 mol/L 盐酸: 水 = 20:1:21, 用 1 mol/L 盐酸调至 pH 为 3.0。

1.2.2 测试样品的制备 称取 1 g 左右的测试样品, 按试验设计加入不同的浸提溶液, 调至 pH 为 3.0, 在超声功率 100 Hz 的条件下超声处理不同时

收稿日期: 2011-08-01

作者简介: 陈敏(1974—), 女, 浙江人, 博士, 主要从事应用微生物及产物分离研究。

基金项目: 兽用抗生素研发及剂型研究开发(技咨 037/2011)。

间。超声结束后,定容至 50 mL。在 8000 r/min 下离心得上清液,备用。

1.2.3 培养基 检定培养基 I 上层:蛋白胨 0.5%,牛肉浸出粉 0.5%,氯化钠 0.8%,磷酸氢二钠 0.2%,琼脂 1%,pH 7.0。检定培养基 II 下层:蛋白胨 0.5%,牛肉浸出粉 0.5%,氯化钠 0.8%,磷酸氢二钠 0.2%,琼脂 2%,pH 7.0。菌种培养基:蛋白胨 1.0%,牛肉浸出粉 0.5%,氯化钠 0.25%,琼脂 1.5%,调节 pH 使灭菌后为 6.5 ± 0.1 ,于 121 °C 灭菌 15 min,制成斜面备用。

1.2.4 检定菌的获得 按照进口兽药标准配制菌种培养基培养得到枯草芽孢杆菌的菌悬液。

1.2.5 检定菌浓度的确定 本试验采用管碟法进行检定菌浓度的确定。将灭菌后的检定培养基 I 融化冷却至 70 °C,按 0.2% 的加量加入不同芽孢数的检定菌菌悬液。每个双碟中加入 10 mL 含菌培养基,均匀摊布、凝固。然后在每个双碟内等距离放置 4 个已灭菌的不锈钢小管,加入同浓度的测试提取样品 200 μ L。室温放置 2~3 h 后,放入培养箱 37 °C 培养 18 h。最后采用多功能微生物自动测量分析仪进行抑菌圈直径的测量并比较形成的抑菌圈。

1.2.6 线性试验 精密称取 59 mg 恩拉霉素标品于 50 mL 容量瓶内,加入经优化确定的浸提液,超声 80 min 并稀释至刻度,摇匀,制成效价浓度为 1000 U/mL 的母液。再依次稀释为不同浓度的标准溶液,备用。按 1.2.5 的步骤在双碟内加入不同浓度的样品溶液,37 °C 培养 18 h 后采用多功能微生物自动测量分析仪进行测量并统计各标准浓度下抑菌圈直径,建立与浓度的对数之间的线性关系。同时观察低浓度标准溶液产生的抑菌圈直径,以产生明显抑菌圈的最小浓度为最低检出限。

2 结果与分析

2.1 浸提时间的确定 在超声功率 100 Hz 的条件下用丙酮浸提溶液 A 对同重量的恩拉霉素预混剂样品超声 30 min (国标,2008)、40、80、120 min 浸提。将不同时间获得的浸提液进行生测法抑菌圈比较(检定菌芽孢数约 10^6 个/mL),结果见图 1。由图 1 可知,随着浸提时间增加,所形成的抑菌圈直径呈上升趋势,但当浸提时间达到 120 min 时,抑菌圈不再增大,表明样品中的恩拉霉素已完全浸出。由于两个标准中都以 30 min 为浸提时间,因此以它为基础对其它时间的浸提液产生的抑菌圈进行比较,结果表明经 40、80、120 min 超声浸提后,其抑菌圈直径分别提高 2.29%、19.84%、18.15%。故确定超声浸提时间为 80 min。

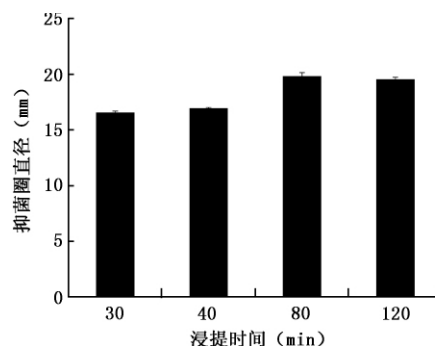


图 1 不同浸提时间的抑菌圈比较

2.2 浸提液的选择 在超声功率 100 Hz、超声时间 40 min 的条件下,采用 pH 3.0 的不同浸提溶液分别进行同重量的恩拉霉素预混剂的浸提。将不同对照液(不同组成的浸提溶液)和样品浸提液进行生测法抑菌圈比较(检定菌芽孢数约 10^6 个/mL),结果见图 2。由图 2 可知,用不同对照液(浸提溶液)和样品浸提液进行生测法,均能出现抑菌圈。对照液中,丙酮浸提溶液 A 和甲醇浸提溶液的抑菌圈明显较大,直径约 13.28 mm;而乙醇浸提溶液、丙酮浸提溶液 B 和水浸提溶液的抑菌圈较小,直径约 10.32 mm,该结果表明后 3 种浸提溶液对检定菌的生长抑制作用较小。用不同浸提溶液提取样品,以丙酮浸提液 A (进口兽药质量标准,1999)的抑菌圈直径为基准,甲醇浸提液(国标,2008)、乙醇浸提液、水浸提液的抑菌圈直径分别降低 9.42%、23.75%、41.58%;而丙酮浸提液 B 的抑菌圈直径则提高 10.48%。故丙酮浸提溶液 B 的浸提效果最佳,确定以该浸提溶液进行后续试验提取。

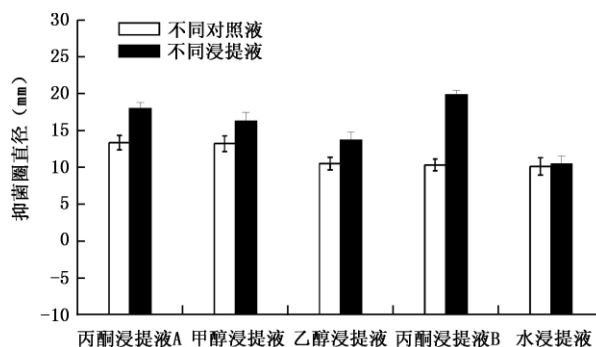


图 2 不同浸提溶液和样品浸提液的抑菌圈比较

2.3 不同菌浓度的检定菌对抑菌圈的影响 称取 1 g 左右的恩拉霉素预混剂样品,在超声功率 100 Hz、超声时间 80 min 的条件下,采用丙酮浸提溶液 B 进行浸提。以含不同芽孢数的枯草芽孢杆菌菌悬液为检定菌,比较形成的抑菌圈直径和抑菌圈形成情况,结果见图 3、4。

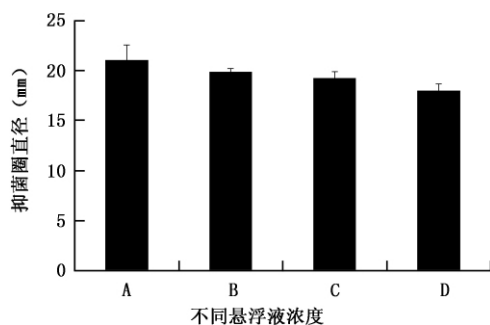


图3 检定菌浓度对抑菌圈的影响

注: A 中枯草芽孢杆菌芽孢数为 1.12×10^5 个/mL; B 中枯草芽孢杆菌芽孢数为 1.83×10^6 个/mL; C 中枯草芽孢杆菌芽孢数为 1.22×10^7 个/mL; D 中枯草芽孢杆菌芽孢数为 1.56×10^8 个/mL。

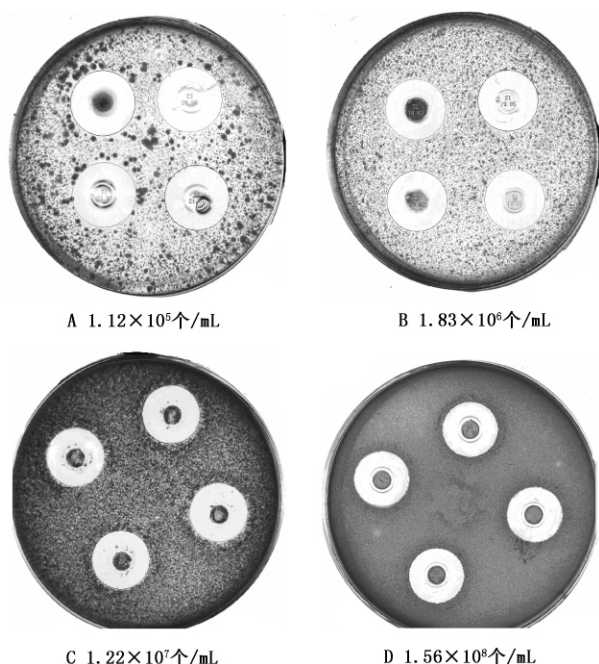


图4 不同检定菌浓度检验下的抑菌圈

图3所示,随着平皿中检定菌芽孢数增加,其抑菌圈直径呈现下降趋势。当检定菌芽孢数为 1.12×10^5 个/mL 时,虽形成的抑菌圈最大,但从图4的A图可以看出平皿中菌苔形成不均匀,抑菌圈的边缘不规则,相对标准误差 RSD 较高,达 7.29%。当检定菌芽孢数达到 1.56×10^8 个/mL 时,检定菌平皿中出现双圈且抑菌圈较小。当检定菌芽孢数在 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL 的范围内,产生的抑菌圈清晰,抑菌圈直径在 18 ~ 22 mm 范围内, RSD 值分别为 1.82% 和 3.44%。因此确定该检定方法的芽孢数在 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL 的范围内,该结果与崔春英等(2007)报道检定菌浓度相符。

2.4 线性试验 按优化条件(丙酮浸提液 B, 浸提时间 80 min)浸提恩拉霉素标品,然后将浸提液稀

释为 35.79、17.89、8.95、4.47、2.24、1.12、0.56、0.28、0.14、0.07 U/mL 等标准溶液。在检定菌芽孢数约为 10^6 个/mL 的条件下,进行了抑菌圈测定。考察各标准溶液中恩拉霉素浓度的对数值 $\lg C$ 与其对敏感微生物生长抑制而产生的抑菌圈直径的关系,结果表明,恩拉霉素标准溶液在浓度为 0.56 ~ 35.79 U/mL 的范围内,其产生的抑菌圈直径与效价的对数值有较好的线性回归性,所得回归方程: $Y = 0.2436X - 3.47436$ 的相关系数 r 达 0.9960,结果见图5,在该方程中, r 值(当 $n=7$ 时) > 0.754 (由相关系数临界值表查得),其置信水平达 95% 以上。根据一元线性回归效果的 F 检验法(才让加等, 2005)得到该方程 F 值为 1452, 远大于 $F_{0.01}(1, 5)$ (由 F 分布临界值表查得为 16.26),该标准直线回归效果极显著。测定各低浓度标品溶液的抑菌圈直径,结果表明当恩拉霉素浓度为 0.14 U/mL 时,其抑菌圈直径(11.11 mm)略大于浸提溶液样品产生的抑菌圈直径(10.32 mm),当恩拉霉素浓度为 0.07 U/mL 时,其抑菌圈直径(10.41 mm)与浸提溶液样品产生的抑菌圈几乎相等,故其最低检出限为 0.14 U/mL。

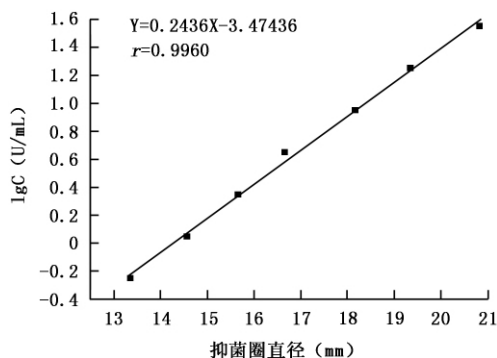


图5 恩拉霉素的标准曲线

2.5 恩拉预混剂测定方法的比较 在检定菌芽孢数约为 10^6 个/mL 的条件下,比较了《进口兽药质量标准》方法(丙酮浸提液 A, 浸提时间 30 min)和优化方法(丙酮浸提液 B, 浸提时间 80 min)浸提相同量恩拉霉素预混剂获得的浸提液的抑菌效果。将测得的抑菌圈直径比对标准曲线,得到表1结果。对同重量恩拉霉素预混剂分别进行了微生物检定法测定,所得抑菌圈直径按 2.4 所得标准方程计算得到样品中的效价含量,结果见表1。表1表明优化方法处理样品得到的抑菌圈直径比原方法大 1.48 mm,且其 RSD 较小。优化方法较原方法,恩拉霉素的回收率提高了 13.17%,故优化后方法较好。

表 1 标准方法和优化方法的比较

	标准方法	优化方法
抑菌圈直径(mm)	15.48±0.36	16.96±0.33
相对标准偏差(%)	2.32	1.95
平均效价(U/mL)	33.89	38.41
回收率(%)	84.74	95.90

3 讨论与小结

恩拉霉素为菌丝体内的代谢产物,一般将菌丝体破碎后恒温震荡提取(杨文革等,2009),因此浸提溶液的选择比较重要。根据已报道的恩拉霉素性质,它不溶于水和纯甲醇,但溶于酸性水和含水甲醇,且恩拉霉素在酸性条件下非常稳定(顾欣等,2008),故本试验结合该物质的相关标准及文献比较了不同酸性溶液浸提效果。结果表明丙酮浸提液浸提效果比甲醇浸提液(国标,2008)浸提效果要好。对丙酮浸提液 A(进口兽药质量标准,1999)和丙酮浸提液 B 比较后发现,后者浸提效果更佳且浸提溶液本身对枯草芽孢杆菌的生长抑制作用弱于浸提液 A,故选择丙酮浸提液 B 更好。另外,将恩拉霉素样品经不同时间比较发现,浸提 80min 的效果好于浸提 30 min(国标,2008),浸提更完全。

通过对微生物检定法中检定条件进行研究,结果表明在超声功率 100 Hz、超声时间 80 min 的条件下用丙酮浸提液 B 浸提恩拉霉素样品,浸提较完全。选择枯草芽孢杆菌芽孢数 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL 作为检定菌浓度,产生的抑菌圈大而清晰,可直接反映出抗生素对微生物的杀死或抑菌能力大小。在优化检定条件的基础上,对恩拉霉素的标品进行微生物检定法测定,结果表明在浓度 0.56~35.79 U/mL 的范围间,其浓度的对数值与相应的抑菌圈直径呈直线相关。所得的一剂量回归方程 $Y=0.2436X-3.47436$ 的相关系数 r 达 0.9960, F 检验其相关性极显著,测量误差较小,与实测数据拟合较好。因此

该回归方程适用于低浓度恩拉霉素样品的含量测定。

参 考 文 献

- 1 万文倩,杨文革,等.微生物检测法测定安来霉素发酵液生物效价[J].饲料检测,2010(3):41~43.
- 2 才让加.化学数据的一元线性回归分析[J].青海师范大学学报(自然科学版),2005(2):13~15.
- 3 仕金.多肽类抗生素饲料添加剂—安来霉素[J].中国兽医杂志,2003,39(4):48~50.
- 4 杨文革,等.一种安来霉素产生菌及利用大孔树脂提取的方法[P].中国专利:200910032340.1,2009-12-09.
- 5 高延玲,班付国,等.微生物浊度法测定安普霉素及其制剂效价的研究[J].中国畜牧兽医,2009,36(5):206~210.
- 6 周岷江,等.恩拉霉素的研究进展[J].中国兽药杂志,2007,41(12):42~44.
- 7 顾欣,蔡金华,刘雅妮,等.饲料中恩拉霉素的微生物学含量测定方法研究[J].中国兽药杂志,2008,42(9):17~21.
- 8 崔春英,等.实用抗生素微生物检定技术[M].郑州:中原农民出版社,2007,20~38.
- 9 舒黛康,等.乳及乳制品中抗生素残留微生物检测法研究进展及其控制措施[J].中国畜牧兽医,2008,35(1):74~77.
- 10 中华人民共和国农业部.进口兽药质量标准(1999版)[S].1999,112~114.
- 11 顾欣,等.中华人民共和国国家标准《饲料中恩拉霉素的测定 微生物学法》[M].北京:中国标准出版社,2008.
- 12 Formica G, Giannone C. Gas chromatographic determination of avilamycin total residues in pig tissues, fat, blood, feces, and urine [J]. Assoc off Anal Chem,1986,69(5):763~766.
- 13 Higashide E. Enduracidin, a new antibiotic I. streptomyces fungicidicus No. B-5477, an enduracidin producing organism [J]. J Antibiot,1968,21:126~137.
- 14 Iwasaki H. Enduracidin, a new antibiotic VIII structures of enduracidins A and B [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1973,21(6):1184~1191.
- 15 Takeda Chemical Industries Ltd(JP). A new antibiotic enduracidin and a process for the production thereof: Britain, 1163270 [P]. 1969-09-04.

The Research of Microbiological Assay for the Enramycin

CHEN Min¹, JIN Ping¹, FANG Zhong²

(1. College of Food Science & Bioengineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012, China;

2. Zhejiang Chysern Technology Co. Ltd., Hangzhou 310014, China)

Abstract: Samples containing enramycin were determined by the double disk method with *Bacillus subtilis* as test micro-organism and antibiotics standardization medium II. The determination conditions were optimized through the investigations of extraction solution composition, extraction time and the concentrations of *Bacillus subtilis*. The linearity of the dose-response relationship was analysed upon it, and the accuracy of the method was checked. The results showed that the optimum determination conditions were acidic acetone solution B and 80 min for extraction. The calibration curve was linear within the range

桔青霉毒素细胞毒性及其检测方法研究

鲁银, 袁慧

(湖南农业大学动物医学院, 湖南长沙 410128)

摘要:桔青霉毒素是一种真菌毒素,多存在于发霉饲料和含红曲添加剂的食品中,对人类和动物的健康有严重危害。作者总结了最近几年国内外关于桔青霉毒素的报道,从体外和体内两个角度详细的综述了桔青霉毒素的毒性和常用检测方法研究进展,为桔青霉毒素的诊断、检测和防治提供一定依据。

关键词:桔青霉毒素;毒性作用;凋亡;检测

中图分类号:Q26

文献标识码:A

文章编号:1671-7236(2012)01-0060-04

桔青霉毒素(Citrinin)是一种常见的真菌次生代谢物,多存在于霉变饲料和食品中。一直以来,桔青霉毒素中毒都是国际关注的重要问题,泰国黄变米、日本的黄酒病和意大利自然发酵香肠事件都与桔青霉毒素有关。Gordon等(2010)也在高血脂病人日常食用的4种红米中检测到桔青霉毒素含量超标,国际生命科学院自然毒素检测委员会欧洲分会将桔青霉毒素列为必须检测的毒素之一。饲料中的桔青霉毒素导致肉鸡血液中不饱和脂肪酸含量升高,食品红色添加剂中桔青霉毒素致癌案例引起国际癌症研究会高度重视。目前,是否将红曲发酵产品作为未来食品着色剂还广有争议(Mapari等,2010)。桔青霉毒素主要是肾毒素,对肝脏和生殖系统也有一定的毒害作用。

1 桔青霉毒素的产生和理化性质

桔青霉毒素(Citrinin)的化学式为(3R,4S)-4,6-二氢-8-羟基-3,4,5-三甲基-6-氧-3H-2-苯吡-7-羧酸,熔点为170~173℃,蔡氏培养液中呈柠檬黄色针状菱形结晶。纯品为黄色三棱状结晶,很难溶于水,可溶于氯仿、丙酮、苯、甲醇等有机溶剂,与溴、

高锰酸钾反应呈阳性,遇三氯化铁生成浅黄色沉淀,继续反应生成褐色溶液。

在自然中,多种真菌能产生桔青霉毒素,包括青霉属中的黄绿青霉、纠缠青霉、点青霉、扩展青霉、瘦青霉、詹森青霉和曲霉属的土曲霉、白曲霉和红曲霉等。Hetherington等首次从桔青霉菌代谢产物中分离纯化了桔青霉毒素。Chen等(2008)研究结果发现,红曲霉属中能分泌桔青霉毒素的真菌都含有3个高度保守基因簇:聚酮合成酶基因 $pksCT$ 、桔青霉毒素主要生物合成酶基因 $ctnA$ 和氧化酶合成基因 $orf3$ 。桔青霉毒素的合成和分泌由菌种类型和外界环境综合决定。外界条件中,温度、湿度、pH、光线和培养基的类型都能影响桔青霉毒素的产生和产量。在MEA培养基中生长的疣状青霉菌,黄光、绿光和纯蓝光照射下赭曲霉毒素A的合成停止,桔青霉毒素却大量合成;黑暗诱导桔青霉毒素的分泌增加;白光、红光和宝蓝色光线下则不产生桔青霉毒素。扩展青霉菌是一种典型的桔青霉毒素分泌菌,但同样在给予白光、红光和宝蓝色光时发现桔青霉毒素的大量分泌(Schmidt-Heydt等,2011)。

2 桔青霉毒素毒性及其毒性机理

桔青霉毒素能对多种动物产生毒性作用,肝脏和肾脏是其靶器官。有报道称,由于肾脏和肝脏的阴阳离子通道分布较多,桔青霉毒素很可能通过这些通道大量进入肝肾细胞蓄积或引起急性中毒。桔青霉毒素对小鼠的口服半数致死量(LD_{50})为110 mg/kg,

收稿日期:2011-07-14

作者简介:鲁银(1987—),女,湖南人,硕士生,研究方向:动物非传染群发病。

通信作者:袁慧(1947—),男,湖南人,博导,从事动物非传染群发病研究。E-mail: yuanhui7269@yahoo.com.cn; Tel:0731-84673712

from 0.56 to 35.79 U/mL between the logarithm of concentration and the diameter of inhibition zone with the 10^6 spores/mL of test microorganism constration, the correlation coefficient was 0.9960. The proposed method has been applied to the determination of samples containing enramycin. The recoveries was 95.90%, relative standard deviation (RSD) was 1.95%. This method applies to the detection of enramycin sample.

Key words: enramycin; extraction; potency determination; microbiological assay