论著

“生鲜牛乳抗生素分解剂”的鉴定与检测

崔生辉　李景云　马　越　胡昌勤　张　力　金少鸿
(中国药品生物制品检定所,北京　100050)

摘　要:**目的**　鉴定“生鲜牛乳抗生素分解剂”的主要成分,调查北京零售牛奶中是否含有“生鲜牛乳抗生素分解剂”。**方法**　通过青霉素分解实验和蛋白电泳实验分析生鲜牛乳抗生素分解剂的有效成分,建立了牛奶中分解剂的检测方法,并运用该方法对从零售市场上随机采集的5个厂家生产的38份牛奶样品进行了分析。**结果**　“生鲜牛乳抗生素分解剂”的主要成分是β-内酰胺酶,运用β-内酰胺酶特异性抑制剂舒巴坦建立了该酶的检测方法,该方法在牛奶中的检出限为4 U/ml β-内酰胺酶。38份市售牛奶样品中63.2%(24/38)检出β-内酰胺酶,21.1%(8/38)样品中残留的β-内酰胺酶可使得25 μg/ml舒巴坦和0.5 μg/ml青霉素G所产生的抑菌圈与添加0.5 μg/ml青霉素G所产生的抑菌圈直径差异大于或等于6 mm;10.5%(4/38)样品中残留的β-内酰胺酶可使得25 μg/ml舒巴坦和0.5 μg/ml青霉素G所产生的抑菌圈与添加0.5 μg/ml青霉素G所产生的抑菌圈直径差异大于或等于10 mm。**结论**　“生鲜牛乳抗生素分解剂”的主要成分β-内酰胺酶为我国不允许使用的食品添加剂,该酶的使用掩盖了牛奶中实际含有的抗生素,为保障人民身体健康,应加强对牛奶中β-内酰胺酶的监管。

关键词:抗生素类;生鲜牛乳抗生素分解剂;β内酰胺酶类;乳

Characterization and Detection of “Antibiotic Destroyer” in Raw Milk

CUI Sheng-hui, LI Jing-yun, MA Yue, HU Chang-qin, ZHANG Li, JIN Shao-hong
(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract: **Objective**　To characterize the components of “antibiotic destroyer” in raw milk and examine its residue determination in raw milk samples collected from the retail stores in Beijing. **Method**　The active component of antimicrobial destroyer in milk samples were analyzed by both penicillin G hydrolyzation test and protein electrophoresis. An antimicrobial destroyer specific detection method in milk samples was developed and 38 milk samples collected from the retail stores in Beijing were examined. **Results**　The active component of antimicrobial destroyer is β-lactamase and a specific detection method was developed through the application of β-lactamase inhibitor sulbactam. The detection limit of the developed method is 4 U/ml β-lactamase in milk samples. Using the developed method, 24 (63.2%) of the 38 milk samples were positive for β-lactamase; 8 samples (21.1%) showed high β-lactamase activity that the difference between the inhibitory zones of the test samples (supplemented with 25 μg/ml of sulbactam plus 0.5 μg/ml of penicillin G) and control samples (supplemented with 0.5 μg/ml of penicillin G only) was equal or higher than 6 mm; 4 samples (10.5%) showed extremely high β-lactamase activity that the difference between the inhibitory zones of the test samples and control samples was higher than 10 mm. **Conclusion**　β-lactamase is illegal food additive in milk products and its application hides the occurrence of antibiotics in milk. Strict supervision should be conducted in order to protect the health of consumers.

Key word: Antibiotics; Antimicrobial Destroyer, βeta-Lactamases, Milk

随着抗生素在乳畜饲养业中的广泛应用,牛奶中抗生素残留问题日益受到国内外的广泛重视,欧美国家已明文禁止抗生素残留超标的牛奶上市[1,2]。我国《生鲜牛乳收购标准》GB 6914—1986明确规定生鲜牛乳系指从正常饲养的、无传染病和乳房炎的健康母牛乳房内挤出的常乳;2001年9月,我国农业部颁布了《无公害食品生鲜牛乳》行业标准,该标准规定生鲜乳中抗生素“不得检出”。我国的“无抗奶”概念也由此引起了消费者和生产者的广泛关注,目前无抗奶已成为通用的国际化原料奶收购标准。因此,国内一些乳品企业为谋求更大的发展,开始提高奶品的卫生标准,打出“无抗”牌。

青霉素是目前治疗牛乳腺炎的首选药物,同时也是牛奶中最常见的残留抗生素。目前市场上出现了“生鲜牛乳抗生素分解剂”,该分解剂经百万倍稀释后可选择性分解牛奶中残留的青霉素。“生鲜牛乳抗生素分解剂”为国家禁止使用的食品添加剂,对人体的安全性没有进行过评价。为保障消费者的身体健康,分析奶制品生产企业使用的“生鲜牛乳抗生素分解剂”的化学组成,建立牛乳制品中抗生素分

作者简介:崔生辉　男　博士

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

解剂的快速检测方法,了解北京零售牛奶样品中β-内酰胺酶的含量是十分必要的。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*) CMCC(B) 28001 购自国家医学菌种保藏管理中心,在营养琼脂上传代培养备用。

1.1.2 培养基 营养琼脂培养基、抗生素检测用培养基 I(pH = 6.5 ±0.1)、抗生素检测用培养基 Ⅳ(pH = 6.1 ±0.1)均购自北京三药科技开发公司。

1.1.3 试剂 实验用 10 U 青霉素药敏纸片购自北京天坛药物生物技术开发公司;舒巴坦、青霉素 G、β-内酰胺酶标准品(4 000 000 U/ml)均购自中国药品生物制品检定所;生鲜牛乳抗生素分解剂从一牛奶生产厂家获得,推荐在牛奶中的使用浓度为 1∶1 000 000;脱脂奶粉购自英国 Oxoid 公司;SDS-PAGE 试剂盒、蛋白质标准品和考马斯亮蓝染色试剂盒均购自美国 BioRad 公司。

1.1.4 主要仪器 抑菌圈测量仪(北京瑞辉旗医疗器械有限责任公司)、GelDoc2000 成像系统(BioRad 公司)、垂直板电泳系统(北京六一仪器厂)8 mm 钢管。

1.2 方法

1.2.1 抗生素检测用培养基制备 参照美国食品药品监督管理局的细菌分析手册牛奶中抑菌物质检测部分[3]。具体方法如下:取 90 mm 灭菌玻璃培养皿,底层加 10 ml 灭菌的抗生素检测用培养基 I(pH = 6.5 ±0.1),凝固后上层加 4 ml 含有 1×10^9 CFU/ml 藤黄微球菌 CMCC(B) 28001 的抗生素检测用培养基 Ⅳ(pH = 6.1 ±0.1),凝固后备用。

1.2.2 生鲜牛乳抗生素分解剂活性分析 将 10 U 青霉素药敏纸片均匀贴在加有藤黄微球菌 CMCC(B) 28001 的抗生素检测用培养基表面,在每个纸片上分别滴加 20 μl 生鲜牛乳抗生素分解剂原液和 1∶2、1∶4 和 1∶8 稀释液,37 ℃培养 18～22 h 后用抑菌圈测量仪测量抑菌圈的直径,同时做生理盐水和青霉素药敏纸片对照。

1.3 SDS-PAGE 电泳 取生鲜牛乳抗生素分解剂和β-内酰胺酶标准品,将试样按 SDS-PAGE 电泳标准方法进行分析[4],电泳后用蛋白考马斯亮蓝染色试剂盒进行染色,GelDoc2000 成像系统进行拍照。

1.4 舒巴坦和青霉素 G 浓度的选择 鉴于生鲜牛乳抗生素分解剂中的主要成分为β-内酰胺酶,为了建立特异性的快速检测方法,对β-内酰胺酶特异性抑制剂舒巴坦和β-内酰胺酶分解底物青霉素 G 的检测使用浓度进行了分析。具体方法如下:在每个加有藤黄微球菌 CMCC(B) 28001 的抗生素检测用培养基上均匀放置 4 个外径为 8 mm 的钢管,在每个钢管中分别加入 200 μl 添加有不同浓度舒巴坦(12.5～800 μg/ml 范围倍比稀释)或青霉素 G(0.05～12.8 μg/ml 范围倍比稀释)的 10 %脱脂奶,确定产生抑菌圈直径在 20 mm 左右的青霉素 G 浓度和不产生抑菌圈的舒巴坦浓度。通过测试不同浓度舒巴坦(12.5～200 μg/ml 范围倍比稀释,其中 200 μg/ml 为最高不产生抑菌圈的舒巴坦浓度)对 400 U/ml β-内酰胺酶(高于推荐使用浓度的 100 倍)活性的抑制作用,选择舒巴坦的使用浓度。运用上述方法测得的青霉素 G 和舒巴坦的使用浓度,测试添加有不同浓度β-内酰胺酶的 10 %脱脂奶试样,以确定本方法的可能检出限。

1.5 牛奶中β-内酰胺酶的检测方法 取待检牛奶样品,按表 1 顺序加入终浓度为 0.5 μg/ml 青霉素 G、25 μg/ml 舒巴坦和 400 U/ml 的阳性对照用β-内酰胺酶,并将表 1 中 1～4 试样各 200 μL 放置于加有藤黄微球菌 CMCC(B) 28001 的同一抗生素检测用培养基上的 4 个 8 mm 钢管中,37 ℃培养培养 18～22 h,量抑菌圈直径。每个试样重复测试 3 遍后取平均值,同时做牛奶试样的空白对照、10 %脱脂牛奶对照、25 μg/ml 舒巴坦对照。

1.6 牛奶试样中β-内酰胺酶检测结果判定

a. 如果待检牛奶试样空白对照在加有藤黄微球菌 CMCC(B) 28001 的抗生素检测用培养基上出现抑菌圈,说明该试样中含有抗菌物质。

b. 在 10 %脱脂牛奶对照试样中,25 μg/ml 舒巴坦对 0.5 μg/ml 青霉素 G 的抑菌作用没有影响;同时 25 μg/ml 舒巴坦可有效抑制 400 U/ml 阳性对照用β-内酰胺酶对 0.5 μg/ml 青霉素 G 的分解作用。

c. 在牛奶试样中,如果添加 0.5 μg/ml 青霉素 G 试样的抑菌圈与添加 0.5 μg/ml 青霉素 G 和 25 μg/ml 舒巴坦试样的抑菌圈差异在 3 mm 以上(含 3 mm),且重复性良好,应判定该试样添加有β-内酰胺酶。

d. 牛奶试样中,如果添加 0.5 μg/ml 青霉素 G 试样的抑菌圈与添加 0.5 μg/ml 青霉素 G 和 25 μg/ml 舒巴坦试样的抑菌圈差异在 3 mm 以下(不含 3 mm),且重复性良好,应判定在该试样品未检出β-内酰胺酶。

e. 经测试,本方法在牛奶试样中对β-内酰胺酶的检出限为 4 U/ml。

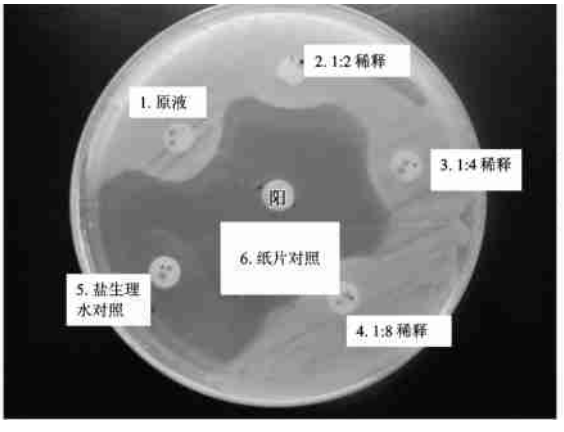
1.7 牛奶样品的采集 在 2006 年 5-8 月间,从北京零售超市中分 3 次随机采集了具有代表性的 5 个厂家生产的不同种类单独包装的牛奶样品 38 个,运

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用本文建立的方法对牛奶样品中β- 内酰胺酶的残留量进行了分析。

2　结果

2.1　生鲜牛乳抗生素分解剂活性的测试　抗生素分解剂 1∶8 稀释后仍可以彻底分解青霉素纸片(10 U)中的青霉素,致使该纸片在添加有藤黄微球菌 CMCC(B) 28001 的抗生素检测用培养基上不产生抑菌圈;而青霉素纸片对照产生的抑菌圈也由于其它纸片中添加的生鲜牛乳抗生素分解剂而变形(图 1)。



注:1. 本图中的纸片均为 10 U 青霉素 G纸片。2. 点 1～4 分别滴加了 20 μl 用生理盐水配制的不同浓度抗生素分解剂溶液;点 5 滴加了 20 μl 生理盐水;点 6 为青霉素 G纸片对照。

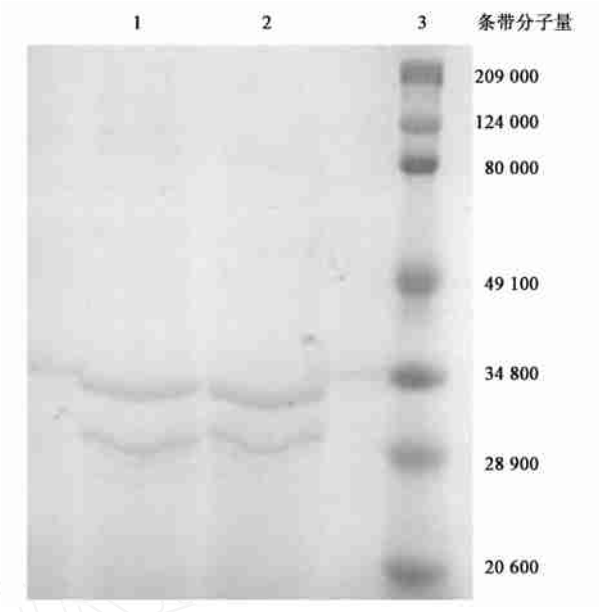
图 1　生鲜牛乳抗生素分解剂对青霉素的分解作用

2.2　SDS - PAGE 分析　SDS - PAGE 分析结果显示,生鲜牛乳抗生素分解剂中含有与β- 内酰胺酶分子量相同的条带,主要蛋白条带的分子量在 28 900～34 800 Da 之间(图 2),且浓度相近。

2.3　青霉素 G浓度的选择　对 10 %脱脂奶中添加 0.015～12.8 μg/ml青霉素 G进行测试发现,含有 0.5 μg/ml青霉素 G的脱脂奶在添加有藤黄微球菌 CMCC (B) 28001 培养基上的抑菌圈直径在 20 mm 左右,该浓度被选择为青霉素 G底物的使用浓度。

2.4　舒巴坦浓度的选择　通过对不同浓度舒巴坦(12.5～800 μg/ml) 测试发现,200 μg/ml的舒巴坦在加有藤黄微球菌 CMCC(B) 28001 的抗生素检测用培养基上不产生抑菌圈;25 μg/ml的舒巴坦可有效抑制 10 %脱脂乳中 400 U/ml的β- 内酰胺酶(高于推荐使用浓度 100 倍) 对 0.5 μg/ml青霉素 G的分解作用,而此浓度距离舒巴坦对藤黄微球菌 CMCC(B) 28001 的最低抑菌浓度(200 μg/ml) 有 8 倍的安全范围。

2.5　牛奶试样中β- 内酰胺酶的测定　运用本文建立的牛奶试样中β- 内酰胺酶检测方法对从北京零售商店随机采集的 5 个厂家生产的 38 个不同种类的牛奶样品进行了测试。24 (63.2 %) 个样品中检出β- 内酰胺酶;其中 8 (21.1 %) 个样品中残留的β- 内酰胺酶可使得添加 25 μg/ml 舒巴坦和 0.5 μg/ml青霉素 G所产生的抑菌圈与仅添加 0.5 μg/ml 青霉素 G所产生的抑菌圈直径差异大于或等于 6 mm;4 (10.5 %) 个样品中残留的β- 内酰胺酶可使得添加 25 μg/ml 舒巴坦和 0.5 μg/ml 青霉素 G所产生的抑菌圈与仅添加 0.5 μg/ml 青霉素 G所产生的抑菌圈直径差异大于 10 mm(表 2)。



注:试样在 SDS - PAGE 上的位置。1.β- 内酰胺酶标准原液;2. 生鲜牛乳抗生素分解剂原液;3. 蛋白质标准品(BioRad,产品编号 161 - 0318)

图 2　生鲜牛乳抗生素分解剂 SDS - PAGE 分析

表 1　牛奶试样中β- 内酰胺酶的检测方法

编号	牛奶试样的处理方法[a]
1	牛奶试样 + 0.5 μg/ml 青霉素 G
2	牛奶试样 + 25 μg/ml 舒巴坦 + 0.5 μg/ml 青霉素 G
3	牛奶试样 + 400 U/ml 阳性对照β- 内酰胺酶 + 0.5 μg/ml 青霉素 G
4	牛奶样品 + 400 U/ml 阳性对照β- 内酰胺酶 + 25 μg/ml 舒巴坦 + 0.5 μg/ml 青霉素 G

注:a. 加样顺序按表中试剂的顺序。

表 2　市售牛奶样品中β- 内酰胺酶的检测结果

生产厂家[a]	样品数量	抑菌圈直径差异(D1 - D2)[b]			
		< 3 mm	≥3 mm	≥6 mm	> 10 mm
A	15	2	13	3	0
B	8	2	6	2	2
C	8	6	2	1	0
D	4	4	0	0	0
E	3	0	3	2	2
总数	38	14	24	8	4

注:a. A～E 分别为不同牛奶制品生产厂家的代码。b. D1: 牛奶试样中添加有 25 μg/ml 舒巴坦和 0.5 μg/ml 青霉素 G所产生的抑菌圈直径;D2:牛奶试样中添加有 0.5 μg/ml 青霉素 G所产生的抑菌圈直径。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

通常认为,对泌乳牛用药不当或不注意安全采乳时间是牛乳中抗生素残留的主要因素。而另外抗生素作为饲料添加剂使用是牛奶中抗生素残留的又一重要原因。对抗生素过敏的人食用含有残留抗生素的牛奶后会发生过敏反应,即使是正常人,食用含有残留抗生素的牛奶也会诱导体内的某些条件致病菌产生耐药,一旦患病,同种类抗生素治疗很难奏效。此外,牛奶中抗生素残留会影响奶的品质,比如用含抗生素的原奶做酸奶或乳酪时,残留的抗生素会抑制细菌的发酵,从而影响制品的产量和质量。因此,世界各国对牛乳中抗生素的残留都非常重视,目前无抗奶已成为发达国家奶制品原料的通用标准。

β- 内酰胺酶是对β- 内酰胺类抗生素耐药的细菌分泌的一种胞外酶,该酶可选择性分解牛奶中残留的β- 内酰胺类抗生素[5]。β- 内酰胺酶是非法的食品添加剂,目前国际和国内均不允许该酶在牛奶中作为添加剂使用。由于缺乏该酶在牛奶中使用的安全性评价数据,生产牛奶添加用β- 内酰胺酶的厂家未经过合法认证,这为我国奶制品的安全埋下了安全隐患。部分国内的牛奶生产者为了达到“无抗”标准,在牛奶中人为添加该分解剂,给我国奶制品市场造成了混乱。另一方面,该分解剂的滥用也助长了牛奶生产中β- 内酰胺类抗生素的滥用,加速了耐药菌的传播,严重威胁了中国奶业的长期发展。

资料显示,国际上尚没有牛奶中β- 内酰胺酶的标准检测方法。实验室分析显示,生鲜牛乳抗生素分解剂原液中的β- 内酰胺酶浓度与β- 内酰胺酶对照品(4 000 000 U/ml) 浓度相近,均在每毫升微克级,而生鲜牛乳抗生素分解剂推荐在牛奶中 1∶1 000 000稀释使用,这一低使用浓度限制了β- 内酰胺酶直接检测方法的使用,如酶联免疫方法、蛋白杂交等方法。β- 内酰胺酶在经过 63 ℃巴氏消毒后仍能保留 50 %的活性[5],而我国市售的牛奶制品大部分采用瞬间超高温(Ultra high temperature, UHT) 的消毒方法,该方法与 63 ℃巴氏消毒相比对蛋白的破坏能力更小,致使该酶在牛奶中的残留活性更高。

尽管多种微生物可以产生β- 内酰胺酶[6],但到目前为止还没有在牛奶中检出β- 内酰胺酶的报道。究其原因可能是由于采奶方式、牛奶的组分、消毒方法和包装储存方法等不适于产β- 内酰胺酶微生物的生存,基于目前我们已有的知识,应认为牛奶中检出的β- 内酰胺酶是人为添加。

为了应对这一特殊情况的出现,本文建立了牛奶中β- 内酰胺酶的检测方法,此方法对牛奶样品中β- 内酰胺酶的检出限为 4 U/ml,该浓度恰为抗生素分解剂的推荐使用浓度。对市售牛奶中β- 内酰胺酶的残留情况分析显示,60 %以上的市售牛奶制品中可检出β- 内酰胺酶,由于所采集的市售牛奶制品均经 UHT 消毒并存放了一定时间,其中的β- 内酰胺酶会有所降解,原料奶中β- 内酰胺酶的检出率应更高。这一数据显示我国牛奶制品存在着严重的安全隐患。

参考文献

[1] ANONYMOUS. 2003. Pasteurized Milk Ordinance, 2003 Revision [OL]. http://www.cfsan.fda.gov/～ear/pmo03toc.html.

[2] ANONYMOUS. 2006. Hygienic Milk Handling and Processing[OL]. http://www.fao.org/AG/aga/publication/mpguide/mpguide1.htm.

[3] MATURIN L J. 2001. Inhibitory Substances in Milk[OL]. http://www.cfsan.fda.gov/～ebam/bam-toc.html.

[4] 汪家政 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社, 2000. 77-100.

[5] KORYCKA-DAHL M, RICHARDSON T, BRADLEY R L Jr. Use of microbial beta-lactamase to destroy penicillin added to milk[J]. J Dairy Sci, 1985, 68(8):1910-1916.

[6] SAMAHA-KFOURY, ARAJ J N G F. Recent developments in beta lactamases and extended spectrum beta lactamases[J]. Bmj, 2003, 327(7425):1209-1213.

[收稿日期:2007 - 01 - 20]

中图分类号:R15;S859.796;TS252.2　　文献标识码:A　　文章编号:1004 - 8456(2007)02 - 0113 - 04

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net