

S₂₈菌株纤维素酶毒性研究

刘欣 谢玮 山东省卫生防疫站 (250014)

摘要 S₂₈菌株能较强地分泌胞外纤维素酶,酶活力强。急性毒性试验、蓄积毒性试验、7天经口试验、微核试验及精子畸形分析的结果表明,该酶急性毒性属无毒、无蓄积毒性、未发现遗传毒性。大鼠90d喂养试验各项指标均为阴性。

关键词 纤维素酶 菌株 毒理学 评价

纤维素酶是由一定菌株发酵产生的,破坏纤维素的 β -D-葡萄糖键,有助于纤维素的分解利用的酶,纤维素酶已广泛应用于农产品加工、医药、饲料、废水废渣处理等方面。^[1,2]为开发S₂₈纤维素酶的应用,保证人民的健康与安全,我们对山东大学微生物研究所分离的S₂₈菌株产生的S₂₈纤维素酶进行了毒性研究。

1 材料与方法

1.1 材料

S₂₈纤维素酶 山东大学微生物研究所提供。

SWISS小鼠 山东大学动物房提供。

WISTAR大鼠 山东大学动物房提供。

1.2 方法

急性毒性试验 选用体重20g左右的小鼠40只及体重为160g左右的大鼠40只,随机将大小鼠各分为4组,每组10只,雌雄各半。采用HORN法,剂量为1.00、2.16、4.64、10.00g/kg B.W,一次性灌胃后观察10d,记录动物死亡数,求出LD₅₀的值。

7d经口试验 在连续多次给予S₂₈纤维素酶的情况下,观察中毒反应。用体重20g左右的小鼠80只,随机分为4组,每组20只,雌雄各半;剂量分别为1, 5, 10g/kg B.W,每天灌胃一次,7d后处死动物,解剖,大体观察有无异常。

蓄积试验 采用蓄积系数法,选体重20g左右的小鼠60只,雌雄各半,每天灌胃一次,第1~4天给予0.1LD₅₀的剂量,以后每4d按1.5

倍递增,连续28d,统计50%动物死亡时的累计总剂量,计算蓄积系数。

微核试验 选11~12周龄的小鼠60只,随机分为5组,每组12只,雌雄各半,剂量为LD₅₀的1/2、1/4、1/8,另设阳性(150mg/kg B.W环磷酰胺)和阴性(蒸馏水)对照组。受试物灌胃24h后,处死动物,取胸骨骨髓制片,固定、染色、镜检。

精子畸形试验 取体重约30g的成年雄性小鼠25只,分为5组,每组5只,受试物的剂量为LD₅₀的1/2、1/4、1/8,另设阳性(30mg/kg B.W环磷酰胺)和阴性(蒸馏水)对照组,连续灌胃5d,于首次后的第35天处死动物,取辜制片、固定、染色、镜检。

90d喂养试验 为了解受试物以不同剂量水平较长期喂养对动物的毒性作用及靶器官的影响,并确定最大无作用剂量,选大鼠48只,随机分为4组,每组12只,雌雄各半。受试物的剂量为10.75g/kg B.W、2.15g/kg B.W、1.80g/kg B.W,另设基础饲料对照组单笼饲养,自由进食饮水。各组动物于试验开始时称体重,试验开始后第60天、90天称体重和取血做血象各指标,并解剖大鼠观察各脏器的病变。

2 结果与讨论

2.1 急性毒性 两种性别大鼠与小鼠在整个试验期未出现死亡,所以其LD₅₀均大于10g/kg B.W。Agger评价碱性纤维素酶的结果为小鼠的LD₅₀是8g/kg B.W,大鼠的LD₅₀是

10g/ kg B. W, 与本实验结果相近; Husband 的结果为大鼠的 LD₅₀ 是 10g/ kg B. W, 小鼠 LD₅₀ 是 10g/ kg B. W, 与本实验结果一致。^[3]

2.2 7d 经口试验 在试验中动物未出现异常表现及死亡, 大体解剖肝、肾和睾丸未发现异常病变。

2.3 蓄积试验 经过 28d 连续给予受试物, 其累计剂量达到 12.8 LD₅₀, 即 128g/ kg B. W, 未出

现动物死亡。蓄积系数 K 大于 5, 该样品为弱蓄积物。

2.4 遗传毒性试验 结果见表 1、2, 由表 1、2 说明 S₂₈ 纤维素酶对小鼠的遗传毒性均未产生影响。Pedersen 的研究证实纤维素酶微核试验和精子畸形试验结果阴性。Hjortkjaer 的结果为酸性纤维素酶无致突变作用,^[9] 与本文结果一致。

表 1 S₂₈菌株纤维素酶对小鼠骨髓细胞诱发的微核率的影响

剂 量 LD ₅₀	动物数	嗜 多 染 红细胞计数	出现嗜多染 红 细 胞 数	微核率 ‰
阴性对照	10	10000	290	2.9
阳性对照	10	10000	2350	23.5
1/2	10	10000	240	2.4
1/4	10	10000	260	2.6
1/8	10	10000	282	2.8

表 2 菌株纤维素酶对小鼠精子畸变的影响

剂 量 LD ₅₀	动物数	分析细胞数	精子畸变数	畸变率 ‰
阴性对照	5	5000	320	64
阳性对照	5	5000	920	184
1/2	5	5000	290	58
1/4	5	5000	295	59
1/8	5	5000	270	54

2.5 90d 喂养试验 在整个试验期中未发现动物异常表现, 对大鼠体重的影响见表 3, 各组间无显著性差异; 血象检查结果红细胞数、白细胞数、血红蛋白含量组间基本一致, 均属本实验室正常范围; 大体解剖各脏器亦未见异常, 脏(肝、心、脾、肾)/体比值各组基本一致(见表 4)。Perry^[3] 的碱性纤维素酶 90d 喂养试验设 0,

0.12, 0.6, 和 3.0g/ kg B. W 4 个剂量组, 在试验过程中记录饮食和饮水量, 试验期末进行血液及生化检查, 解剖各脏器进行大体观察及显微镜观察, 结果显示在 3.0g/ kg B. W 的剂量下碱性纤维素酶不引起大鼠的各种改变, 本文结果的无作用剂量为 10.75g/ kg B. W。

表 3 S₂₈菌株纤维素酶 90d 喂养对大鼠体重增长的影响 ($\bar{x} \pm SD$)

性别	剂量 g/kg	动物数	初始	60d	90d
雄性	对照	6	131 ±25	272 ±29	328 ±29
	10.00	6	128 ±24	274 ±36	326 ±45
	2.15	6	130 ±13	274 ±30	336 ±43
	1.08	6	129 ±15	243 ±36	289 ±73
雌性	对照	6	137 ±18	192 ±17	215 ±25
	10.00	6	139 ±20	193 ±18	216 ±23
	2.15	6	141 ±14	211 ±30	225 ±32
	1.08	6	138 ±23	205 ±19	226 ±21

表 4 S₂₈菌株纤维素酶 90d 喂养对大鼠脏体比的影响 ($\bar{x} \pm SD$) × 10⁻²

性别	剂量 g/kg	动物数	心/ 体	肝/ 体	脾/ 体	肾/ 体
雄性	对照	6	0.45 ±0.14	3.42 ±0.04	0.33 ±0.01	0.71 ±0.09
	10.00	6	0.35 ±0.04	3.21 ±0.07	0.35 ±0.06	0.65 ±0.01
	2.15	6	0.37 ±0.07	3.16 ±0.03	0.31 ±0.08	0.62 ±0.03
	1.08	6	0.44 ±0.09	3.23 ±0.04	0.32 ±0.09	0.66 ±0.09
雌性	对照	6	0.44 ±0.04	3.93 ±0.20	0.33 ±0.06	0.69 ±0.07
	10.00	6	0.46 ±0.03	3.77 ±0.18	0.45 ±0.05	0.73 ±0.02
	2.15	6	0.41 ±0.03	3.66 ±0.08	0.40 ±0.10	0.73 ±0.01
	1.08	6	0.48 ±0.03	3.54 ±0.24	0.43 ±0.08	0.68 ±0.04

3 参考文献

- 1 林风. 纤维素酶的生物化学和分子生物学进展. 生命科学, 1994, 6(1): 18~ 23
- 2 Wulff Strobel C R, Cloning sequencing and characterization of membrane - associated prevotella ruminicola B (1) 4beta - glucosidase with cellodextrinase and cyannogly cosidase activities. J Bacteriol 1995, 177 (20): 5884 ~ 5890
- 3 Greenough R J, et al. Safety evaluation of alkaline cellulase. Food Chem Toxicol, 1991, 29(11): 781 ~ 785
- 4 Sahid I B, Yap M Y. Effects of two acetanilide herbicides on microbial populations and their cellulytic activities. Bull Environ Contain toxicol, 1994, 52(1): 61~ 68
- 5 上海第一医学院主编. 食品毒理. 北京: 人民卫生出版社, 1978, 206~ 215
- 6 卫生部. 食品安全性评价程序和方法. GB 15193. 1—94. 1994—08—20
- 7 Hjortkjaer R K, et al. Safety evaluation of Celluclast, an acid cellulase derived from trichoderma reset. Food and Chemical Toxicology, 1986, 24(1): 35 ~ 63