

文章编号: 1674-5566(2010)03-0410-05

对虾保鲜剂急性毒性和致突变作用研究

邹礼根, 刘超

(杭州市农业科学研究院农产品加工研究所, 浙江 杭州 310024)

摘要:采用霍恩氏法进行对虾保鲜剂对小白鼠的急性毒性试验研究, 结果表明:对虾保鲜剂对雌雄小鼠半数致死量(LD₅₀值) >10 g/kg体重, 毒性分级属实际无毒级。在加与不加代谢活化系统(S-9)的条件下, 利用4个组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌菌株(TA97、TA98、TA100、TA102), 采用平板渗入进行鼠伤寒沙门氏菌哺乳动物微粒体酶试验(Salmonella typhimurium mammalian microsomal enzyme test Ames), 研究对虾保鲜剂的致突变作用, 结果表明:对虾保鲜剂对4个菌株诱发的回变菌落数与阴性对照组的回变菌落数之间没有显著差异($P>0.05$), 均未超过阴性对照组2倍, Ames试验结果为阴性, 表明对虾保鲜剂对鼠伤寒沙门氏菌无直接和间接致突变作用。

关键词:对虾; 保鲜剂; 急性毒性; 鼠伤寒沙门氏菌哺乳动物微粒体酶试验

中图分类号: S 983; TS 201.6 **文献标识码:** A

Study on acute toxicity and mutagenicity of prawn preserving reagent

ZOU Li-gen, LIU Chao

(Institute of Farming Products Processing, Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310024, China)

Abstract: The acute toxicity test of prawn preserving reagent to mice was studied by Horn's. The test revealed that median lethal dose(LD₅₀) of prawn preserving reagent in mice was >10 g/kg. According to the acute toxicity standard rules, the test object was practically non-toxic grade. The Ames test of prawn preserving reagent to Salmonella typhimurium histamine-auxotroph mutants(TA97, TA98, TA100, TA102) was conducted. The revertant colonies of test groups were not two times more than negative control groups. There were not significant differences($P>0.05$) between groups. The result of the Ames test was negative and showed the sample of Prawn preserving reagent did not contain any direct or indirect acting mutagenicity to the test strains.

Key words: prawn; preserving reagent; acute toxicity; Ames test

对虾营养丰富, 味道鲜美, 倍受人们喜爱。但是, 对虾体内含有多种酚氧化酶^[1], 会将虾体内酪氨酸等物质氧化成醌类等黑色素^[2]。因此, 对虾极易黑变变质, 保鲜期短, 严重制约了其商品价值和深加工技术发展^[3-5]。目前, 对虾等虾

类防黑保鲜方面研究是水产加工领域中一个重要课题^[6]。课题组经过多年的攻关研究, 成功开发了一种对虾保鲜剂。该保鲜剂应用在南美白对虾防黑变保鲜中效果明显, 南美白对虾在50 mg/kg浓度的保鲜剂中浸泡30 min, 4℃冷藏条

收稿日期: 2009-05-21

基金项目: 浙江省科技计划项目(2007F70048)

作者简介: 邹礼根(1978-), 男, 工程师, 硕士, 主要从事农产品加工与农产品安全方面的研究。E-mail: jgszlg@163.com

件下,保鲜期 132 h 比未使用保鲜剂的对照品延长 36 h; -18℃冷冻条件下,保鲜期 14个月,比未使用保鲜剂的对照品延长 8个月;保鲜后的产品卫生指标均符合浙江省无公害南美白对虾要求^[7]。实验进行了保鲜剂对小白鼠的急性毒性和致突变作用研究,为进一步扩大其应用规模提供安全性评价和科学依据^[8-9]。

1 材料与方法

1.1 对虾保鲜剂

杭州市农业科学研究院开发,白色粉末状,易溶于水。生产批号:20070512,主要成分(%) :天然提取物(固体植酸)36、三聚磷酸钠 24、聚丙烯酸钠 10、亚硫酸氢钠 8、柠檬酸 10、维生素 C 6、山梨酸钾 4、L谷氨酸 1、EDTA二钠 1。

1.2 试验动物

ICR小鼠,清洁级,雌雄各半,小鼠体重 18~25 g由浙江省实验动物中心提供,动物合格证号:0003224,0003250。

1.3 菌种

组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 TA97、TA98、TA100和 TA102由复旦大学医学院提供,菌种经生物学性状鉴定合格后进行试验。

1.4 Ames试验阳性对照物

9-氨基吡啶(9-AA)、2,7-二氨基芴(2,7-AF)和叠氮钠(NaN₃)、丝裂霉素 C(MMC)、2-乙酰氨基芴(2AF)和 1,8-二羟基蒽醌由杭州市疾病预防控制中心提供。

1.5 S-9混合液(代谢活化系统)

S-9混合液由杭州市疾病预防控制中心提供。

1.6 急性毒性试验方法

急性毒性试验方法采用霍恩氏法^[10]。

1.6.1 剂量设计

设计 4个实验剂量(mg/kg),最低剂量 1 000 mg/kg,剂量按递增公比,4个剂量分别为:1 000 mg/kg, $1\ 000 \times \sqrt[3]{10} = 2\ 150$ mg/kg, $2\ 150 \times \sqrt[3]{10} = 4\ 640$ mg/kg和 $4\ 640 \times \sqrt[3]{10} = 10\ 000$ mg/kg。对虾保鲜剂用蒸馏水做溶媒,分别配制成上述 4种剂量浓度。

1.6.2 方法

取 ICR小鼠 40只,每组 10只,雌雄各半,禁食 16 h,按 0.01 mL/g体重的量经口灌胃染毒,连续观察 7 d记录动物中毒表现及死亡。

1.7 鼠伤寒沙门氏菌微粒体酶试验(Ames试验)

Ames试采用平板掺入法^[10]。

1.7.1 对虾保鲜剂样品剂量设计

称取对虾保鲜剂样品 0.2 mg加蒸馏水至 100 mL,同时称取保鲜剂样品 0.8 mg, 4.0 mg, 20.0 mg, 100.0 mg和 500.0 mg分别加蒸馏水至 10.0 mL混匀后隔水煮沸 20 min灭菌。试验时,每平皿加 0.1 mL,即剂量分别为每皿 0.2 μg, 8 μg, 40 μg, 200 μg, 1 000 μg和 5 000 μg。

1.7.2 阳性对照物剂量设计

阳性对照物剂量参照 GB15193.4-2003,使用剂量:9-AA(50 μg)、2,7-AF(20 μg)、NaN₃(1.5 μg)、MMC(0.5 μg)、2AF(10 μg)、1,8-二羟基蒽醌(50 μg)。

1.7.3 预试验

用 TA97、TA98、TA100和 TA102共 4株菌的非代谢活化系统进行预试验,结果剂量在每皿 5 000 μg时出现明显增菌现象,因此正式试验时选用每皿 0.2 μg, 8 μg, 40 μg, 200 μg和 1 000 μg 5个剂量。

1.7.4 增菌培养

取营养肉汤培养基 5 mL,加入无菌试管中,接种 TA97、TA98、TA100和 TA102菌株,37℃,每分钟 100次转速条件下,振荡培养 10 h至对数增长期。

1.7.5 接种培养

在保温的顶层培养基中依次加入测试菌株新鲜增菌液 0.1 mL,加样品 0.1 mL(需活化时另加入 10% S-9混合液 0.5 mL),混匀,迅速倾入底层培养基上,使顶层培养基均匀分布在底层上,平放固化,37℃培养 48 h,计数回变菌落数。

1.8 试验设计

试验设计 4个试验组。样品组:加 1.7.3中 5个不同剂量样品;阳性对照组:不加样品物,分别加 1.7.2中 6种标准诱变剂;溶剂对照组:加除样品和标准诱变剂以外的所有试剂;未处理对照组:只在培养基上加菌液。每个试验组又分别进

行加代谢活化系统 (+S⁻⁹)和不加代谢活化系统 (-S⁻⁹)2组试验。某些阳性致突变物需在加 S⁻⁹条件下,才能使相应的沙门氏菌突变型产生回复突变,试验中阳性对照物 2-乙酰氨基苄和 1,8-二羟基蒽醌需要加 S⁻⁹代谢活化系统。

1.9 数据处理

每组试验分别做 3 个平皿,试验数据(回变菌落数)均以 $\bar{X} \pm SD$ 表示,利用 SPSS 10.0 软件进行分析处理,采用 t 检验比较实验组间的差异

性。

2 结果

2.1 对虾保鲜剂急性毒性试验

对虾保鲜剂急性毒性试验时,采用 0.01 mL/g 体重的量经口灌胃染毒给药。每个剂量组各取雌雄 ICR 小鼠 5 只,分开饲养,连续观察 7 d 记录动物中毒表现及死亡。试验结果见表 1。

表 1 对虾保鲜剂对小白鼠急性毒性试验结果
Tab. 1 Results of the acute toxicity test of prawn preserving reagent to mice

| 性别 | 分组剂量 (mg/kg) | 动物数 (只) | 死亡动物数 (只) | 死亡率 (%) |
|----|--------------|---------|-----------|---------|
| 雄性 | 10 000 | 5 | 0 | 0 |
| 雌性 | 10 000 | 5 | 0 | 0 |
| 雄性 | 4 640 | 5 | 0 | 0 |
| 雌性 | 4 640 | 5 | 0 | 0 |
| 雄性 | 2 150 | 5 | 0 | 0 |
| 雌性 | 2 150 | 5 | 0 | 0 |
| 雄性 | 1 000 | 5 | 0 | 0 |
| 雌性 | 1 000 | 5 | 0 | 0 |

由表 1 急性毒性试验结果可知,在 7 d 观察期内,对虾保鲜剂的 4 种使用剂量对所有试验动物均无中毒及死亡情况出现。急性毒性试验中,对虾保鲜剂最大使用剂量为每千克体重 10 g 因此,对虾保鲜剂对雌雄小鼠半数致死量 (LD₅₀值) > 10 g 查 GB15193.3-2003 中急性毒性剂量分级表^[10],判定对虾保鲜剂毒性分级属实际无毒级。

2.2 对虾保鲜剂致突变作用试验

在加与不加的代谢活化系统 (S⁻⁹)的条件下,采用平板渗入法进行 Ames 试验,研究对虾保鲜剂致突变作用。第 1 次试验的回变菌落数结果见表 2。

由表 2 可知,在加 S⁻⁹和加 S⁻⁹条件下,样品组的 5 种不同剂量对虾保鲜剂对 4 个菌株诱发的回变菌落数相差不大,没有显著差异 ($P > 0.05$),没有剂量反应关系。对虾保鲜剂对 4 个菌株诱发的回变菌落数与 2 个阴性对照组(溶剂对照组和未处理对照组)的回变菌落数也基本相当,没有显著差异 ($P > 0.05$),不具有统计学上的可比性,更未超过 2 个阴性对照组 2 倍。样品组与阳性对照组比较,回变菌落数相差极大,具有非常显著差异 ($P < 0.01$)。

因此,按照 GB15193.4-2003 方法判定,Ames 第 1 次试验结果为阴性,需要进行第 2 次

重复试验,实验结果见表 3。

通过由表 3 与表 2 的比较可知,第 2 次试验的回变菌落数与第 1 次试验的回变菌落数基本相当,没有发生大的变化。同样,对虾保鲜剂对 4 个菌株诱发的回变菌落数与 2 个阴性对照组的回变菌落数之间没有显著差异 ($P > 0.05$),均未超过 2 个阴性对照组 2 倍。

因此,Ames 试验结果为阴性,表明对虾保鲜剂对鼠伤寒沙门氏菌无直接和间接致突变作用。

3 讨论

对虾保鲜剂主要成分是固体植酸,学名为肌醇六磷酸脂,是从植物种籽中提取的一种多功能的新型食品添加剂^[11],是食品添加剂使用卫生标准中规定的抗氧化剂之一,在食品工业中应用广泛^[12]。植酸小白鼠口服半致死量 LD₅₀为 4 192 mg/kg 比食盐的 4 000 mg/kg 更高,毒性极低,使用安全^[13],食品添加剂使用卫生标准规定,植酸在虾类保鲜中按需适量使用。保鲜剂配方中其它主要成分 LD₅₀ 分别是^[14]: V_c > 5 000 mg/kg、亚硫酸氢钠 > 2 000 mg/kg、聚丙烯酸钠 > 10 000 mg/kg、柠檬酸 > 6 730 mg/kg、三聚磷酸钠 > 6 500 mg/kg、山梨酸钾 > 4 920 mg/kg、EDTA 二钠 > 2 000 mg/kg。因此,以固体植酸为

主要原料,配伍其它食品添加剂,经处理加工而成的对虾保鲜剂能达到属于实际无毒级。

表 2 对虾保鲜剂 Ames试验第一次回变菌落数结果
Tab. 2 Results of the first Ames test of prawn preserving reagent

| 试验组别 | 剂量 (μg) | 回变菌落数 ($\bar{X}\pm\text{SD}$) | | | | | | | |
|--------|----------------------|---------------------------------|------------|---------------|----------|----------------|------------|----------------|------------|
| | | TA97 | | TA98 | | TA100 | | TA102 | |
| | | -S-9 | +S-9 | -S-9 | +S-9 | -S-9 | +S-9 | -S-9 | +S-9 |
| 样品组 | 1 000 | 98.3±6.5 | 104.7±3.5 | 32.3±1.5 | 33.0±2.6 | 137.7±8.6 | 125.6±4.0 | 266.0±23.3 | 251.3±8.1 |
| | 200 | 109.7±12.1 | 92.0±2.6 | 31.0±2.0 | 33.0±7.8 | 142.0±12.5 | 138.7±12.1 | 267.7±4.9 | 252.0±21.1 |
| | 40 | 105.3±13.2 | 105.7±11.0 | 32.7±4.2 | 31.0±1.7 | 145.3±5.7 | 123.7±5.7 | 269.0±10.5 | 254.0±10.6 |
| | 8 | 108.0±20.4 | 107.3±12.7 | 31.0±4.6 | 31.7±2.1 | 140.0±13.5 | 133.7±6.7 | 262.0±11.5 | 260.3±11.5 |
| | 0.2 | 112.3±12.7 | 111.7±17.6 | 31.7±3.5 | 31.0±3.5 | 142.7±17.5 | 132.7±4.7 | 264.3±15.0 | 258.7±11.0 |
| 溶剂对照组 | 蒸馏水 | 100.0±5.0 | 114.3±6.1 | 33.7±3.2 | 30.7±3.1 | 152.0±10.6 | 138.0±2.0 | 261.3±36.9 | 263.3±5.8 |
| 未处理对照组 | — | 107.3±13.8 | 107.7±12.9 | 30.0±2.0 | 30.3±2.1 | 144.3±9.3 | 136.3±7.5 | 264.0±6.2 | 256.7±12.5 |
| 阳性对照组 | 9-氨基吡啶 (50) | 1 290.0±127.3* | | | | | | | |
| | 2,7-二氨基芴 (20) | 815.0±219.2* | | | | | | | |
| | 叠氮钠 (1.5) | 1 890.0±127.3* | | | | | | | |
| | 丝裂霉素 C (0.5) | 2 390.0±410.1* | | | | | | | |
| | 2-乙酰氨基芴 (10) | 1 140.0±84.8* | | 2 830.0±42.4* | | 1 230.0±123.1* | | | |
| | 1,8-二羟基蒽醌 (50) | | | | | | | 1 375.0±487.9* | |

注: -S-9为不加代谢活化系统; +S-9为加代谢活化系统;与样品组比较 * $P<0.01$ 以下同。

表 3 对虾保鲜剂 Ames试验第二次回变菌落数结果
Tab. 3 Results of the second Ames test of prawn preserving reagent

| 试验组别 | 剂量 (μg) | 回变菌落数 ($\bar{X}\pm\text{SD}$) | | | | | | | |
|--------|----------------------|---------------------------------|------------|----------|----------|------------|------------|------------|------------|
| | | TA97 | | TA98 | | TA100 | | TA102 | |
| | | -S-9 | +S-9 | -S-9 | +S-9 | -S-9 | +S-9 | -S-9 | +S-9 |
| 样品组 | 1 000 | 122.0±11.3 | 129.3±18.1 | 34.7±5.5 | 32.0±6.9 | 166.7±8.3 | 155.3±8.1 | 249.3±3.1 | 276.7±37.9 |
| | 200 | 110.7±8.3 | 139.0±10.8 | 33.3±1.5 | 31.3±3.1 | 174.0±12.2 | 153.3±1.5 | 271.3±27.1 | 300.0±26.5 |
| | 40 | 119.0±12.0 | 131.0±9.0 | 31.3±3.2 | 32.0±3.0 | 159.7±15.5 | 157.3±8.0 | 263.7±6.7 | 278.0±13.0 |
| | 8 | 116.0±15.1 | 144.0±6.0 | 32.0±4.0 | 31.7±0.6 | 155.3±13.6 | 160.7±4.7 | 259.3±15.3 | 270.7±16.6 |
| | 0.2 | 122.3±5.7 | 133.0±24.0 | 30.7±4.2 | 32.7±4.0 | 163.0±7.5 | 156.3±15.3 | 263.0±14.5 | 277.7±13.4 |
| 溶剂对照组 | 蒸馏水 | 117.5±14.8 | 133.0±24.0 | 32.0±5.3 | 33.7±5.9 | 163.3±13.3 | 160.0±4.0 | 265.3±5.0 | 257.0±9.8 |
| 未处理对照组 | — | 112.3±12.4 | 141.0±11.5 | 31.3±1.5 | 32.0±4.0 | 153.3±5.9 | 154.7±9.4 | 263.7±6.7 | 273.3±10.3 |

Ames试验方法由美国 Ames教授首先发明,是检测具有遗传毒性的化合物对 DNA 碱基损伤的一种灵敏、快速、简便的方法,可通过某待测物质对微生物的诱变能力间接判断其致突变作用。其原理主要为人工诱变鼠伤寒沙门氏菌菌株使其操纵子基因点突变,形成组氨酸营养缺陷型突变菌株^[15]。该方法适用于对食品添加剂、保鲜

剂、消毒剂和药物残留等物质致突变性的安全性评价。课题组开发的对虾保鲜剂主要成分是天然提取物固体植酸,以及 GB2760里规定范围内的食品添加剂,这些添加剂按要求使用,均无致突变性,因此,对虾保鲜剂在每皿 1 000 μg 的范围内,对鼠伤寒沙门氏菌无直接和间接致突变作用。

对虾体内存在大量酚氧化酶,易发生酶促褐变。植酸能有效抑制酚氧化酶的活性^[16],阻止氧化反应。保鲜剂配方中的L谷氨酸、V_C也是酚氧化酶的强力抑制剂^[17],配方中还含有防腐、保水等成分。因此,对虾保鲜剂使用效果明显,同时实验结果表明保鲜剂为实际无毒级,无致突变性,使用安全,为进一步扩大其应用规模提供了安全性评价的基础资料。

参考文献:

- [1] Simpson B K, Marshall M R, O well W S. Phenol oxidase from shrimp (*Penaeus setiferus*): purification and some properties [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1987, 35 (6): 918—921.
- [2] Bailey M E, Fieger E A, Novak A F. Phenol oxidase in shrimp and crab [J]. *Food Research*, 1960, (25): 557—564.
- [3] 张芝芬,吴汉民.对虾在冰藏条件下的保鲜剂筛选 [J]. *浙江水产学院学报*, 1998, 17(4): 269—273.
- [4] 戴志远.虾类保鲜与防黑变技术 [J]. *海洋水产科技*, 1995, (2): 24—27.
- [5] 高华,刘坤.新型虾类保鲜剂用于对虾保鲜的实验研究 [J]. *青岛大学学报*, 2001, 16(1): 16—19.
- [6] 马清河,胡常英,刘丽娜,等.葡萄糖氧化酶用于虾保鲜的实验研究 [J]. *食品工业科技*, 2005, 26(6): 159—162.
- [7] 浙江省质量技术监督局. DB33/399.3—2003,无公害南美白对虾 [S]. 浙江, 2003.
- [8] 冯作山,郑杰,罗红霞,等.鲜肉保鲜剂的急性毒性试验研究 [J]. *食品科学*, 2007, 27(3): 207—209.
- [9] 丁玉庭. Ames致突变性试验在熏鱼加工中的应用 [J]. *水产科学*, 1998, 17(3): 19—22.
- [10] 中华人民共和国卫生部. GB15193—2003,食品安全性毒理学评价程序和方法 [S]. 北京:中国标准出版社, 2003.
- [11] 李维强,林奇,毕阳.植酸对蕨菜保鲜与护色的影响 [J]. *保鲜与加工*, 2004, (5): 16—17.
- [12] 中华人民共和国卫生部. GB2760—2007,食品添加剂使用卫生标准 [S]. 北京:中国标准出版社, 2007.
- [13] 赵玉生,于然.植酸的食品保鲜机理及应用 [J]. *中国食品添加剂*, 2007, (1): 147—150.
- [14] 孙平.食品添加剂使用手册 [M]. 北京:化学工业出版社, 2004. 11, 51, 78, 254, 443.
- [15] 林朝晖. Ames试验在水质检测方面的应用 [J]. *微生物学通报*, 2002, 29(3): 66—70.
- [16] 陈丽娇,郑明锋,李怡宾.南美白对虾多酚氧化酶的生化特性 [J]. *福建农林大学学报:自然科学版*, 2004, 33(3): 377—380.
- [17] 赵娇,戚晓玉,尤瑜敏,等.日本对虾的酚氧化酶特性研究 [J]. *上海水产大学学报*, 1997, 6(3): 157—165.