Ovomucin的抗菌特性及其对环境条件的稳定性

单媛媛，马美湖*，元志伟，朱涵宇，黄 茜，左思敏
(华中农业大学食品科学技术学院，国家蛋品工程技术研究分中心，湖北 武汉 430070)

摘 要：为了深入了解Ovomucin的抗菌活性及其稳定性，以食品中常见的3种污染菌(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌)为受试菌种，以最小抑菌质量浓度和生长曲线作为测试指标，对Ovomucin的体外抗菌效果进行评价，并考察不同的温度和酸碱环境对Ovomucin抑菌效果的影响。结果表明：Ovomucin对不同细菌的抗菌活性有较显著的差异($P<0.05$)，其中对大肠杆菌和沙门氏菌抑制作用较强，最小抑菌质量浓度分别为0.05mg/mL和0.4mg/mL，而对金黄色葡萄球菌则无明显的抑制作用；在中性和弱碱性条件下，Ovomucin对大肠杆菌的抑制效果最好；温度低于100℃时，Ovomucin对大肠杆菌的抑菌活性具有较好的热稳定性，当加热温度达到100℃时，随加热时间的延长，抑菌效果减弱。

关键词：Ovomucin；抗菌；pH值；温度

Antibacterial Activity of Ovomucin and Its Stability to pH and Temperature

SHAN Yuan-yuan，MA Mei-hu*，YUAN Zhi-wei，ZHU Han-yu，HUANG Xi，ZUO Si-min
(National Research and Development Center for Egg Processing, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract：Turbidimetry was used to determine the antibacterial activity of ovomucin against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella*. pH and temperature induced changes in the antibacterial rate against *Escherichia coli* were also investigated. A significant difference was observed in the antibacterial activity against different bacteria. Ovomucin showed obvious anti-bacterial activity against *Escherichia coli* and *Salmonella*, with MIC of 0.05 mg/mL and 0.4 mg/mL, respectively, while it had no significant effect on the growth of *Staphylococcus aureus*. In addition, better antibacterial effect on *Escherichia coli* occurred in neutral and alkaline conditions. Good thermal stability of the antibacterial activity against *Escherichia coli* was observed below 100 ℃. However, a reduction in the antibacterial activity appeared with increasing heating time.

Key words：ovomucin；antibacterial；pH；temperature
中图分类号：Q539 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)05-0001-04

黏蛋白是一类含有硫酸酯的高度糖基化的唾液酸糖蛋白，广泛分布于细胞外间质及各种分泌物中[1]，具有调节细胞黏附、阻止外源微生物侵染等多种生理功能[2]。作为一种典型的黏蛋白，卵黏蛋白(ovomucin)主要存在于禽蛋蛋清中，占蛋清质量的3.5%左右[3]，是维持蛋清的黏度和凝胶特性的关键成分[4-5]，不仅具有保护蛋黄免受外源微生物破坏及物理损伤的作用，而且具有降低血清胆固醇水平[6]及抑制肿瘤细胞增殖等多种生理功能[7]。鸡蛋贮存过程中蛋清的稀变乃至后期的腐败变质很大程度上与Ovomucin的降解有关[8-9]。在鲜蛋贮藏过程中，外源微生物的侵染是导致鸡蛋腐败变质的关键因素之一，已有研究[10]发现Ovomucin能够有效抑制幽门螺杆菌的生长繁殖，Kazuo等[11]首次报道了Ovomucin对大肠杆菌O157:H7具有抑制作用，并且推测其抗菌活性可能与蛋白分子中的唾液酸有关，但是目前关于Ovomucin对其他病原菌及腐败菌的作用尚未见有文献报道。由于禽蛋组成成分复杂，在贮藏过程中体系环境也会发生一定程度的变化，对抗菌活性的影响因素也很多，Ovomucin活性的稳定性也有待研究。为深入了解鸡蛋中Ovomucin的抗菌活性及其在贮藏加工中的稳定性，本实验采用食品中具有代表性的常见菌种大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌为实验菌种，对Ovomucin的体外抗菌性能进行评价，并主要针对不同的温度和pH值处理对其抗菌性的影响进行了相关的研究，旨在为鸡蛋的贮存保鲜及Ovomucin在食品中的应用奠定一定的理论基础。

收稿日期：2011-12-09
基金项目：国家自然科学基金项目(31101320)；国家现代农业(蛋鸡)产业技术体系建设专项(CARS-41-K23)；中央高校基本科研业务费专项(2011QC028)；华中农业大学大学生科技创新基金(SRF)项目(A065)
作者简介：单媛媛(1984—)，女，博士研究生，主要从事禽蛋蛋白质化学与生物化学研究。E-mail：yuan930@yahoo.cn
*通信作者：马美湖(1957—)，男，教授，博士，主要从事肉类、蛋品科学理论与加工利用研究。E-mail：mameihuhn@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大肠杆菌(*Escherichia coli*，ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*，ATCC 29213)、沙门氏菌(*Salmonella*，CICC 21482)均由农业微生物国家重点实验室提供，本实验室保存。

卵黏蛋白(ovomucin)：由本实验室制备，经HPLC鉴定纯度为99.13%。

营养琼脂(BR)、营养肉汤(BR) 青岛高科技园海博生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

YM75型不锈钢立式电热蒸汽消毒器 上海三申医疗器械有限公司；SW-CJ-2D型双人单面净化工作台 苏州净化设备有限公司；SPX-25085-Ⅱ生化培养箱 上海新苗医疗器械有限公司；ZHWY-2102C恒温培养振荡器 上海智城分析仪器制造有限公司；iMark酶标仪 美国Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种的活化与接种

菌种解冻后于无菌操作台上接种到营养肉汤中，然后在37℃恒温培养振荡器中培养12h，其中的菌落数达到10^{10}数量级，即达到活化的要求，可以制成菌体悬液作为实验菌种。

1.3.2 最小抑菌质量浓度的测定(MIC)

最小抑菌质量浓度采用2倍稀释法进行测定，实验过程参照文献[12]进行。

1.3.3 生长曲线的测定[13-14]

活化的菌种用灭菌的营养肉汤稀释至菌体浓度为10^8CFU/mL后取100μL加到96孔板内，然后再在样品孔加入100μL的Ovomucin溶液(0.05mg/mL，经过0.45μm的细菌过滤器过滤)混匀，37℃恒温培养箱中培养24h后于酶标仪上测定OD_{600nm}值。以OD_{600nm}值对培养时间作图绘制菌体生长曲线。同时设置空白对照、阳性对照和阴性对照，每孔5个平行，实验重复3次。

1.3.4 抑菌率的测定

96孔板中依次加入稀释的活化菌悬液100μL，0.05mg/mL的Ovomucin溶液(0.45μm的细菌过滤器过滤)100μL，混匀后于37℃恒温培养箱中培养24h，酶标仪上测定OD_{600nm}值。空白对照为100μL培养基加100μL生理盐水，对照组为生理盐水代替样品组的Ovomucin溶液，抑菌率按照以下公式计算。

$$抑菌率/\%=\frac{对照组OD_{600nm}-实验组OD_{600nm}}{对照组OD_{600nm}-空白对照组OD_{600nm}}\times 100$$

1.3.5 Ovomucin的酸碱稳定性

选用大肠杆菌为受试菌种，用pH值为2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、7.4、8.0、8.4、9.0、9.35、10.0、11.0的柠檬酸盐和硼酸盐缓冲液溶解样品，4℃放置过夜，为消除离子种类和蛋白浓度对实验结果的影响，抑菌实验用相应pH值的灭菌缓冲液做空白对照，蛋白终质量浓度为0.05mg/mL。抑菌率的测定按照1.3.4节的方法进行。

1.3.6 Ovomucin的热稳定性

磷酸盐缓冲液(20mmol/L、pH7.4 PBS)溶解的Ovomucin分别在25、35、45、55、65、75、85、95℃条件下加热10min，100℃分别处理5、10、20、30min后立即冷却到室温，经不同方式的热处理后Ovomucin对大肠杆菌的抑制效果用抑菌率表示。

2 结果与分析

2.1 Ovomucin对不同细菌的抑制效果

采用常量肉汤稀释法研究了不同质量浓度的Ovomucin对本实验室保存的沙门氏菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果。结果如表1所示，可以看出，Ovomucin对3种细菌的抗菌性有较显著的差异，其中对大肠杆菌和沙门氏菌均有不同程度的抑制作用，最小抑菌质量浓度分别为0.05mg/mL和0.4mg/mL，而在实验的浓度范围内对金黄色葡萄球菌没有表现出明显的抑制作用。

表1 Ovomucin对沙门氏菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最小抑菌质量浓度(MIC)

Table 1 MIC of ovomucin against *Salmonella*、*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Ovomucin质量浓度/(mg/mL)	*Escherichia coli*	*Salmonella*	*Staphylococcus aureus*
0(空白对照)	+	+	+
阴性对照(青霉素)	—	—	—
0.010	+	+	+
0.025	+	+	+
0.050	—	+	+
0.100	—	+	+
0.200	—	+	+
0.400	+	—	+
0.800	—	—	+
1.600	—	—	+
3.200	—	—	+

注：—. 葡萄糖-酚红肉汤培养基没有变色，无菌体生长；+. 葡萄糖-酚红肉汤培养基变成黄色，有菌落生长。

由图1可知，不同质量浓度的Ovomucin对大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌率存在差异，在Ovomucin质量浓度小于0.05mg/mL时，大肠杆菌对各实验质量浓度敏感性在95%水平上差异不显著，当Ovomucin质量浓度高于0.05mg/mL后，随Ovomucin质量浓度的增加，抑菌率逐渐增大，各质量浓度之间存在显著性差异。图中的抑菌曲线同时显示沙门氏菌对0.10mg/mL的Ovomucin的敏感性较差，但是统计学分析表明：在0～0.2mg/mL范围内，Ovomucin对沙门氏菌的抑菌率没有显著性的差异($P>0.1$)。只有在Ovomucin的质量浓度超过0.4mg/mL后，其对沙门氏菌的抑菌率与其他质量浓度组相比才具有显著性差

异($P<0.05$)，并且质量浓度与抑菌率之间呈剂量反应关系。这也与表1的研究结果相吻合。

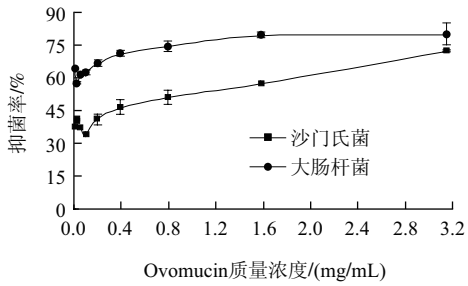


图1 不同质量浓度Ovomucin对大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌率

Fig.1 Inhibitory rates of ovomucin at different concentrations against *Salmonella* and *Escherichia coli*

2.2 Ovomucin对细菌生长曲线的影响

采用比浊法测定了不同质量浓度的Ovomucin对3种细菌的生长曲线的影响，结果如图2所示。

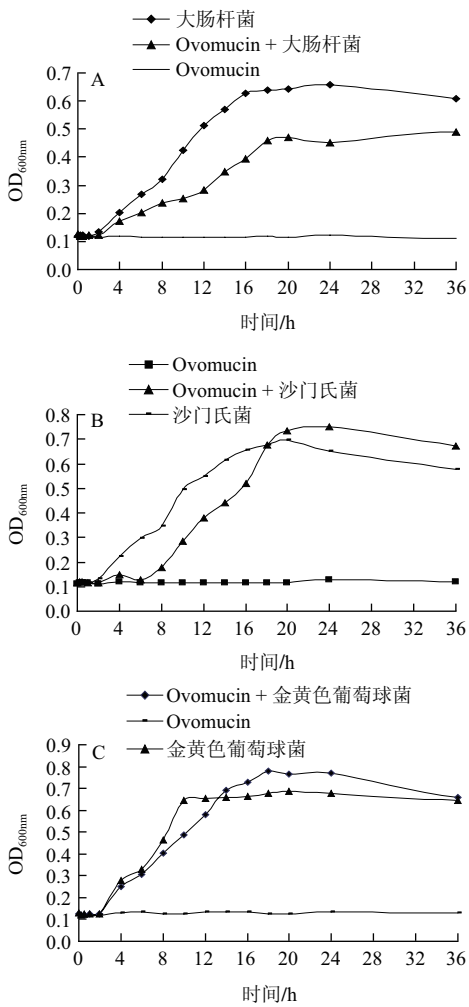


图2 Ovomucin对大肠杆菌(A)、沙门氏菌(B)和金黄色葡萄球菌(C)生长曲线的影响

Fig.2 Effect of ovomucin on the growth curve of *Escherichia coli*(A), *Salmonella*(B) and *Staphylococcus aureus*(C)

由于Ovomucin本身在600nm波长处无吸收，所以图2中各条曲线的起点均为细菌增殖前培养基和起始菌液光密度的总和，无需进行校正即可以进行生长曲线间的比较。由图2可知，Ovomucin对实验用3种细菌生长曲线的影响有较显著的差异，在图2A中，加入0.05mg/mL Ovomucin后大肠杆菌的生长曲线在整个生长周期均位于对照组(细菌培养液不加Ovomucin)之下，表明大肠杆菌在生长周期的整个过程中都受到明显抑制；在图2B中，加入Ovomucin后，沙门氏菌的在适应期和对数期生长受到抑制，但是进入稳定期后菌体数量增多，因此，Ovomucin对沙门氏菌发挥作用的方式是延缓菌体的对数期，但是没有明显的杀菌活性。而图2C的结果表明Ovomucin对金黄色葡萄球菌则没有明显的抑制作用，这也与表1的研究结果一致。

Ovomucin对3种受试菌株表现出不同的抑制活性，对于大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌效果相对优于金黄色葡萄球菌，Ovomucin对不同细菌的抑制效果和作用方式的不同可能与细菌本身的组成成分有关，胃黏蛋白可以通过抑制细胞壁的生物合成抑制幽门螺旋杆菌的繁殖[15]，可以猜测本实验蛋清Ovomucin可能通过作用于大肠杆菌的细胞壁来影响细菌的生长繁殖，由于革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌)和阴性菌(大肠杆菌)的细胞壁成分和结构不同，引起Ovomucin作用的差异。但具体机制还需要进一步的研究。

2.3 Ovomucin抑菌活性的酸碱稳定性

鸡蛋贮藏过程中，伴随着蛋清的稀变，pH值会有一个升高的变化过程[16]，这种环境条件的变化使鸡蛋在贮藏后期开始腐败变质，这就说明pH值的改变对相关活性蛋白的构象和生理活性有着重要的影响，Ovomucin抑菌活性随pH值的改变与鸡蛋的腐败具有一定的相关性；另外，通常制备的Ovomucin需要在特定pH值条件下才能有效溶解[17]，所以研究Ovomucin抑菌活性对pH值的敏感性具有重要意义。鉴于Ovomucin对大肠杆菌的抑制效果良好，测定了不同酸碱处理后Ovomucin的对大肠杆菌的抑制率，结果见图3。

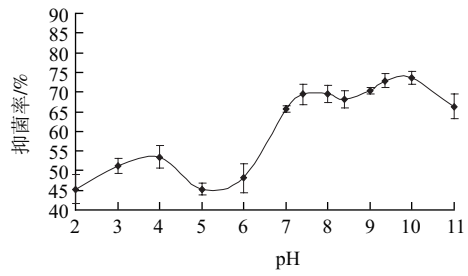


图3 酸碱处理对Ovomucin抑菌性的影响

Fig.3 Effect of pH on the inhibitory rate of ovomucin against *Escherichia coli*

由图3可知，Ovomucin在pH2～11范围内均具有不同程度的抑菌作用，同时不同的pH值处理对Ovomucin的抗菌活性影响显著($P<0.05$)，在酸性条件下Ovomucin的抗

菌性降低，随着pH值升高抑菌率有增大的趋势，表示其抑菌活性在中性到偏碱性条件下更强，在pH值超过8之后其抗菌活性有一个降低的过程，这与鸡蛋的贮藏期pH值变化一致。但是在pH10左右活性又有所上升，这可能是因为在pH10的弱碱条件下Ovomucin分子中的糖苷键会发生一定程度的降解，导致分子伸展，部分糖链释放，抗菌活性位点暴露，从而更利于对菌体识别。黏蛋白的糖链结构作为信号识别的重要位点，在其抑菌活性中发挥着非常重要的作用[18-20]。在碱性条件下的抑菌作用可能与Ovomucin分子中释放的唾液酸及糖醛酸有关。

2.4 Ovomucin抑菌性的热稳定性

为了更全面的了解温度对Ovomucin活性的影响，分别研究了不同的处理温度(图4)和高温处理不同时间(图5)对Ovomucin抑菌率的影响。为消除pH值差异造成的影响，将蛋白溶解液及对照无菌生理盐水的pH值均调到7.4。

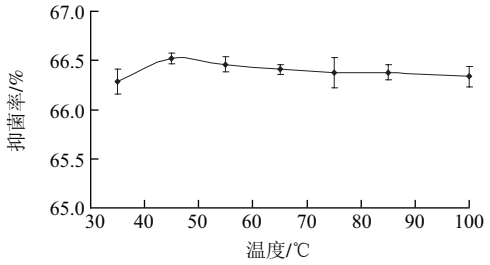


图 4 加热温度对Ovomucin抑菌活性的影响

Fig.4 Effect of temperature on the inhibitory rate of ovomucin against *Escherichia coli*

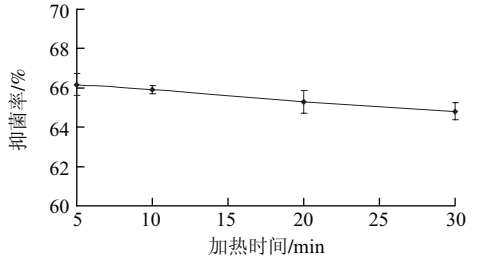


图 5 加热时间对Ovomucin抑菌活性的影响

Fig.5 Effect of heating time on the inhibitory rate of ovomucin against *Escherichia coli*

由图4、5可知，Ovomucin具有较好的热稳定性。Ovomucin经25～95℃不同的处理10min，对供试的大肠杆菌的抑菌率仍达60%以上；随着加热温度的上升，Ovomucin对大肠杆菌的抑菌活性略有降低，但变化不显著。当加热温度升高至100℃后随加热时间延长活性呈现逐渐降低，但仍然表现出一定的抑菌效果。即使经100℃处理30min，Ovomucin对大肠杆菌的抑菌率仍达60%以上，由此可见，Ovomucin对温度有很好的耐受性。

3 结 论

作为一种富含唾液酸的糖蛋白，Ovomucin对不同细菌的抑菌性有显著的差异($P<0.05$)，其中对大肠杆菌和沙门氏菌抑制作用较强，而对金黄色葡萄球菌无明显影响；Ovomucin的大肠杆菌的抑菌活性具有一定的热稳定性和酸碱稳定性。在中性和弱碱性条件下，抑菌效果明显；温度低于100℃时Ovomucin对大肠杆菌的抑菌活性具有较好的热稳定性，当加热温度达到100℃，随加热时间延长，抑菌效果减弱。

参考文献：

[1] MAHOMED F. Recent advances in mucin immunohistochemistry in salivary gland tumors and head and neck squamous cell carcinoma[J]. Oral Oncol, 2011, 47(9): 797-803.

[2] MCGUCKIN M A, LINDEN S K, SUTTON P, et al. Mucin dynamics and enteric pathogens[J]. Nat Rev Microbiol, 2011, 9(4): 265-278.

[3] WU J P, OMANA D A, WANG J P. Ovomucin: a glycoprotein with promising potential[J]. Trends Food Sci Technol, 2010, 21(9): 455-463.

[4] 单媛媛, 马美湖. Ovomucin化学特性与功能研究进展[J]. 食品科学, 2009, 30(23): 528-532.

[5] RABOUILLE C, AON M A, MULLER G, et al. The supramolecular organization of ovomucin. biophysical and morphological studies[J]. Biochem J, 1990, 266(3): 697-706.

[6] NAGAOKA S, MASAOKA M, ZHANG Q, et al. Egg ovomucin attenuates hypercholesterolemia in rats and inhibits cholesterol absorption in Caco-2 cells[J]. Lipids, 2002, 37(3): 267-272.

[7] 左思敏, 单媛媛, 马美湖, 等. Ovomucin抗肿瘤机制研究进展[J]. 中国家禽, 2011, 33(18): 47-50.

[8] BURLEY R W, VADEHRA D V. The albumen: chemistry[M]. New York: John Wiley, 1989: 65-128.

[9] SONS DONOVAN J W, DAVIS J G, WIELE M B. Viscometric studies of alkaline degradation of ovomucin[J]. J Agric Food Chem, 1972, 20(2): 223-228.

[10] KODAMA Y, KIMURA N. Inhibitor of *Helicobacter pylori* colonization: US, 6,235,709 B1[P]. 1999.

[11] KAZUO K, MAKOTO H, YUKIKO H K, et al. Glycopeptide derived from hen egg ovomucin has the ability to bind enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(18): 5740-5746.

[12] 左娟, 马美湖. 鸡蛋涂膜保鲜剂中抑菌物质的筛选[J]. 食品科学, 2010, 31(9): 20-21.

[13] 陶令霞, 夏铁骑, 常慧萍. 两种测定固氮菌NT06菌株生长曲线方法的比较[J]. 生物学杂志, 2007, 24(5): 57-58.

[14] 杨典洱, 林晓怡, 王艳丽, 等. 壳多糖抑制细菌生长的构效关系[J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(7): 1277-1281.

[15] MASATOMO K, YUKI I, YUKIE O, et al. Natural antibiotic function of a human gastric mucin against helicobacter pylori infection[J]. Science, 2004, 305(13): 1003-1006.

[16] WANG J, OMANA D, WU J. Effect of shell eggs storage on ovomucin extraction[J]. Food Bioprocess Tech, 2011, 5(6): 1-5.

[17] SHAN Y, MA M, HUANG X, et al. Simple pH treatment as an effective tool to improve the functional properties of ovomucin[J]. Food Sci, 2012, 77(7): C740-C745.

[18] MICHAEL A M, SARA K L, PHILIP S, et al. Mucin dynamics and enteric pathogens[J]. Microbiology, 2011, 9: 265-278.

[19] ROBERT H Y, RODNEY W, SIOK-BI W, et al. Sialic acid glycoproteins inhibit *in vitro* and *in vivo* replication of rotaviruses[J]. J Clin Invest, 1987, 79: 148-154.

[20] DIARMUID T K, EMMA C S, SARA K L, et al. Presence of terminal *N*-acetylgalactosamine *β*-1, 4-*N*-acetylglucosamine residues on *O*-linked oligosaccharides from gastric MUC5AC: involvement in *Helicobacter pylori* colonization[J]. Glycobiology, 2012, 22(8): 1077-1085.