

## 蛋清、重组溶菌酶酶学性质及其对小鼠肠道菌群和血清生化指标的影响

田洪源 刘明启 戴贤君\*

(中国计量学院生命科学院食品系 杭州 310018)

**摘要** 目的:研究蛋清、重组溶菌酶酶学性质,探讨两种溶菌酶最佳应用条件;通过小鼠口服试验,研究溶菌酶对小鼠肠道菌群和血清生化指标的影响。方法:在不同温度、pH、人工胃液及金属离子条件下,以微球菌为底物,用比浊法测定溶菌酶酶活变化;在小鼠饮水口服溶菌酶(蛋清溶菌酶和重组溶菌酶酶活分别为2 500,5 000 U/mL)后无菌取肠道内容物,通过微生物培养测定肠道菌群的变化;测定不同试验时间的血清总蛋白、尿素氮、甘油三酯、胆固醇的浓度。结果:蛋清溶菌酶最适温度40℃,最适pH 6.0;重组溶菌酶最适温度45℃,最适pH 6.0;两种溶菌酶在温度超过50℃后活性迅速下降,其中重组溶菌酶下降较快;两种溶菌酶在室温、pH 6~9溶液中60 min,酶活力均保持在80%以上;在人工胃液中,溶菌酶活性迅速下降; $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ 均不同程度地抑制两种溶菌酶活性;动物试验结果表明,两种溶菌酶均能不同程度地降低小鼠肠道金黄色葡萄球菌和粪肠球菌数量,促进双歧杆菌和乳酸杆菌生长,但重组溶菌酶对大肠埃希菌群抑制作用明显( $P < 0.05$ ),蛋清溶菌酶不明显( $P > 0.05$ );不同浓度的两种溶菌酶均能提高血清总蛋白含量,降低尿素氮和胆固醇含量,其中以重组溶菌酶(5 000 U/mL)饲喂小鼠21 d后血清总蛋白、尿素氮、胆固醇同对照组差异显著( $P < 0.05$ )。结论:蛋清、重组溶菌酶均具有调节机体肠道菌群,影响血清指标的作用,其中重组溶菌酶的效果更明显,但使用过程需要注意温度、pH、胃液、金属离子对酶活的影响。

**关键词** 蛋清溶菌酶;重组溶菌酶;酶学性质;肠道菌群;血清生化指标

文章编号 1009-7848(2012)10-0016-08

溶菌酶(Lysozyme)是一种能够断裂细菌细胞壁肽聚糖中N-乙酰葡萄糖胺和N-乙酰胞壁酸之间的 $\beta$ -1,4糖苷键的专性水解酶,属于胞壁质酶<sup>[1]</sup>。溶菌酶能选择性地溶解目标微生物细胞壁而使其失活,对其它营养成分无影响,故作为防腐剂已广泛应用于食品保鲜领域<sup>[2-3]</sup>。

随着研究的深入,溶菌酶的其他功能逐渐被发现,如阻止病毒繁殖,分解粘多糖,增强抗生素药效,促进肠道有益细菌繁殖等<sup>[4-5]</sup>。据报道溶菌酶对肠道中腐败性微生物有特殊的杀灭作用,直接或间接地促进婴儿肠道内双歧杆菌的增殖,促进人工喂养婴儿肠道菌群的正常化<sup>[6]</sup>。另据报道,溶菌酶还能够增强机体对感染的抵抗力,特别是对

早产婴儿的消化器官疾病有预防效果<sup>[7]</sup>,因此溶菌酶可作为食品、配方奶粉的新型营养功能因子。

溶菌酶来源广泛,可以从动物、植物及微生物中提取,已有较多基因工程重组溶菌酶的报道<sup>[8-11]</sup>。由于不同溶菌酶的最适作用条件各不相同,了解溶菌酶酶学性质对减少其在食品工业应用中的损失,降低温度、pH、金属离子等条件对其的影响具有较大意义。另外,溶菌酶对动物肠道菌群的影响缺乏具体的研究报道,影响了其作为营养功能食品添加剂的推广应用。

蛋清溶菌酶和重组溶菌酶是目前食品工业中应用较为广泛的两种溶菌酶。本文以蛋清溶菌酶和重组溶菌酶为对象,研究两种溶菌酶的酶学性质,探讨不同浓度的两种溶菌酶对小鼠肠道菌群和血清生化指标的影响,为溶菌酶作为功能食品添加剂的应用提供依据。

收稿日期:2012-10-22

基金项目:浙江省科技计划资助项目(2008C12053)

作者简介:田洪源,男,1986生,硕士生

通讯作者:戴贤君

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

酶活 20 000 U/mg 的蛋清溶菌酶,自提;酶活 5 000 U/mg 的重组溶菌酶为含人源溶菌酶基因的毕赤酵母表达产物,浙江某公司提供;微球菌干粉,购自南京建成生物工程有限公司;麦康凯培养基、Baird-Parker 琼脂培养基、粪肠球菌琼脂培养基、BS 琼脂培养基和 MRSA 琼脂培养基,购自青岛高科园海博生物技术有限公司;其它化学试剂均为国产分析纯级。SPF 级昆明种小鼠,雌雄各半,体重 18~22g,购于浙江省医学院动物中心。

### 1.2 溶菌酶酶学性质研究

1.2.1 溶菌酶酶活力的测定 以微球菌干粉为底物,按照比浊法测定溶菌酶酶活<sup>[12]</sup>。酶活力单位的定义为,每分钟  $OD_{450}$  值下降 0.001 为 1 个活力单位 (U)。两种溶菌酶均在相同酶活条件下进行试验。

#### 1.2.2 温度对溶菌酶活性的影响及其热稳定性

当 pH 7.0 时,测定溶菌酶在 30,35,40,45,50,55 和 60 °C 条件下的酶活,确定最适温度。将溶菌酶溶液分别在 30,40,50,60,70,80 和 90 °C 水浴中处理 60 min,冰浴 3 min,于对应最适条件下测定残余酶活,确定热稳定性。

#### 1.2.3 pH 值对溶菌酶活性的影响及其 pH 稳定性

在最适温度条件下分别测定两种溶菌酶在底物 pH 5.0,5.5,6.0,6.5,7.0,7.5 和 8.0 条件下的酶活,确定最适 pH。将溶菌酶分别加入 pH 值为 3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0 和 9.0 的磷酸缓冲溶液中,室温静置 60 min,于最适条件下测定残余酶活,确定 pH 稳定性。

#### 1.2.4 人工胃液、肠液对溶菌酶活性的影响

人工胃液:将 16.4 mL 1 mol/L 盐酸溶于 800 mL 无菌水中,调 pH 至 2.0,加胃蛋白酶 10 g,定容 1 000 mL。人工肠液:将 6.8 g 磷酸二氢钾溶于 500 mL 无菌水中,用 4% NaOH 调 pH 至 6.8,加胰蛋白酶 10 g,定容 1 000 mL。将溶菌酶加入上述人工胃液、肠液中,分别处理 0,30,60,90 和 120 min,于对应的最适温度、pH 条件下测定残余酶活,确定其在人工胃、肠液中的稳定性。

1.2.5 金属离子对溶菌酶活性的影响 分别向溶菌酶中添加  $FeCl_3$ 、 $MnSO_4$ 、 $ZnSO_4$ 、 $MgSO_4$ 、 $CaCl_2$ 、

$KCl$ 、 $AlCl_3$ 、 $CuSO_4$ ,各种金属离子终浓度均为 0.005 mol/L,同时以不加金属离子的酶液作对照,室温静置 60 min,于对应的最适温度、pH 条件下测定残余测定酶活,确定金属离子对两种溶菌酶活性的影响。

### 1.3 溶菌酶对小鼠肠道菌群及血清指标的影响

1.3.1 动物分组及给药 取体重 18~22 g、SPF 级昆明种小鼠 120 只,随机分为对照组、蛋清溶菌酶

组、蛋清溶菌酶组、重组溶菌酶组、重组溶菌酶组,每组小鼠 24 只(雌雄各半),在饮水中添加溶菌酶(、组的蛋清溶菌酶和重组溶菌酶酶活分别为 2 500、5 000 U/mL)。小鼠自由采食、饮水,每日定时更换饲料、饮水。

1.3.2 小鼠血清分离及测定 小鼠预饲喂 1 d 适应环境,于试验第 1、7、14、21 天每组取 6 只小鼠,摘眼球取血分离血清,送浙江省中医药大学动物中心测定血清样品中总蛋白、尿素氮、甘油三酯、胆固醇的含量。

1.3.3 小鼠肠道菌群分析 取血后颈椎脱臼法处死小鼠,在无菌条件下剪开腹腔取盲肠内容物,置于 EP 管中冷藏待用。盲肠内容物分别稀释  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  倍,吸取 50  $\mu$ L 稀释液分别涂布麦康凯培养基、Baird-Parker 琼脂培养基、粪肠球菌琼脂培养基、BS 琼脂培养基和 MRSA 琼脂培养基,37 °C 恒温培养、分离大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、双歧杆菌和乳酸杆菌。待菌落长出,选菌落数适合计数的稀释度计数(同稀释度平均菌落数为  $X$ ),计算每克盲肠内容物中的细菌数量(CFU/g)。

细菌数量(CFU/g 样本)= $X/0.05 \times$ 稀释倍数 $\times 1/\text{标本质量(g)}$ 。

### 1.4 数据分析

用 Excel 表格统计数据,然后用 SPSS 中邓肯(Duncan)多重比较。以  $P < 0.05$  为显著水平,结果以平均数 $\pm$ 标准差表示。

## 2 结果和分析

### 2.1 蛋清、重组溶菌酶的酶学性质

2.1.1 温度对溶菌酶活性的影响及其热稳定性 随着底物温度的升高,两种溶菌酶酶活均呈先升高后降低的趋势,其中蛋清溶菌酶最适温度为 40

℃,重组溶菌酶最适温度为 45℃(图 1)。当将溶菌酶置于环境温度高于 50℃的条件下处理 60 min 时,蛋清溶菌酶、重组溶菌酶活迅速下降,其中重

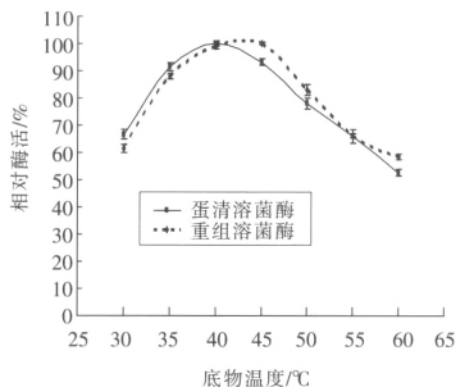


图 1 温度对蛋清溶菌酶和重组溶菌酶活性的影响

Fig.1 Effect of temperature on the activity of egg white lysozyme and recombinant lysozyme

### 2.1.2 pH 值对溶菌酶活性的影响及其 pH 稳定性

随底物 pH 值的升高,两种溶菌酶酶活变化基本相同,均呈先升高后降低的趋势,且两者最适 pH 均为 6.0(图 3)。两种溶菌酶在 pH 7 的缓冲液中室温处理 60 min,酶活性不变。在 pH 值小于 6 的

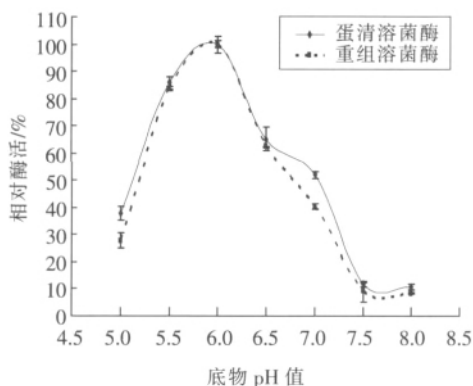


图 3 pH 对蛋清溶菌酶和重组溶菌酶的影响

Fig.3 Effect of pH on the activity of egg white lysozyme and recombinant lysozyme

2.1.3 人工胃液、肠液对溶菌酶活性的影响 在人工胃液中,随处理时间的延长,两种溶菌酶酶活均呈平稳下降趋势。蛋清溶菌酶处理 90 min 后,仅残留 2.53%酶活;处理 120 min 时,酶完全失活。重组溶菌酶处理 90 min 后,残留 7.50%酶活;处理

组溶菌酶酶活下降较快,说明其热稳定性较蛋清溶菌酶差(图 2)。

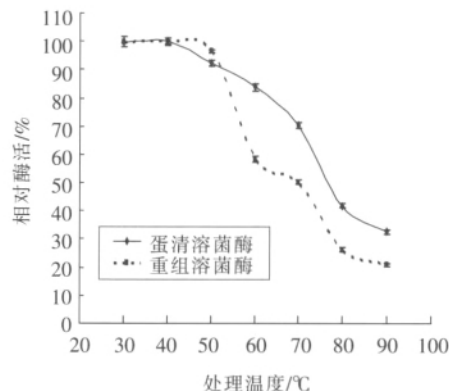


图 2 蛋清溶菌酶和重组溶菌酶活性的热稳定性

Fig.2 The thermostability of egg white lysozyme and recombinant lysozyme

酸性环境下两种溶菌酶活性受影响较大。在 pH 6~9 范围室温处理 60 min 后,两种溶菌酶酶活力均保持 80%以上,其中碱性条件对重组溶菌酶的影响稍大于蛋清溶菌酶(图 4)。

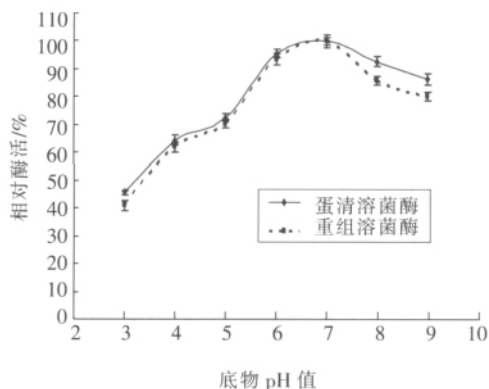


图 4 蛋清溶菌酶和重组溶菌酶的 pH 稳定性

Fig.4 The pH stability of egg white lysozyme and recombinant lysozyme

120 min 时,酶完全失活(图 5)。在人工肠液中,重组溶菌酶稳定性明显优于蛋清溶菌酶。蛋清溶菌酶处理 120 min 时酶完全失活,而重组溶菌酶仍保留 44.85%酶活(见图 6)。

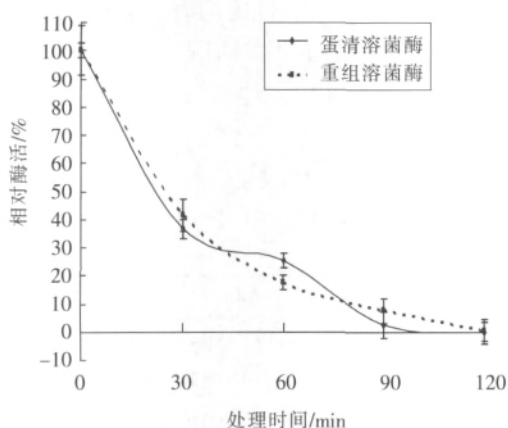


图5 人工胃液对蛋清溶菌酶和重组溶菌酶稳定性影响  
Fig.5 Effect of artificial gastric liquid on activity of egg white lysozyme and recombinant lysozyme

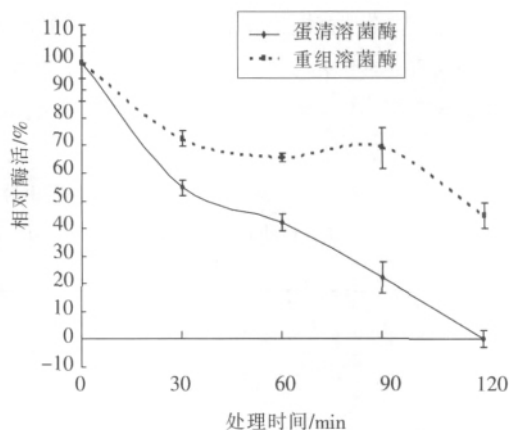


图6 人工肠液对蛋清溶菌酶和重组溶菌酶稳定性影响  
Fig.6 Effect of artificial bowel liquid on activity of egg white lysozyme and recombinant lysozyme

2.1.4 金属离子对溶菌酶活性的影响 金属离子均能不同程度地抑制蛋清溶菌酶活性, 其中  $\text{Fe}^{3+}$  对酶活抑制作用最强, 与对照组相比活性为 72.46%;  $\text{K}^+$  抑制作用最弱, 为 91.89%;  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  抑制活性均为 88% 左右;  $\text{Fe}^{3+}$  对重组溶菌酶抑制作用最强, 为 66.14%;  $\text{Ca}^{2+}$  抑制作用最弱, 为 96.84%;  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  对重组溶菌酶抑制作用介于 82.81%~93.68% 之间 (图 7)。两种溶菌酶受  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  影响差异不显著 ( $P>0.05$ )。

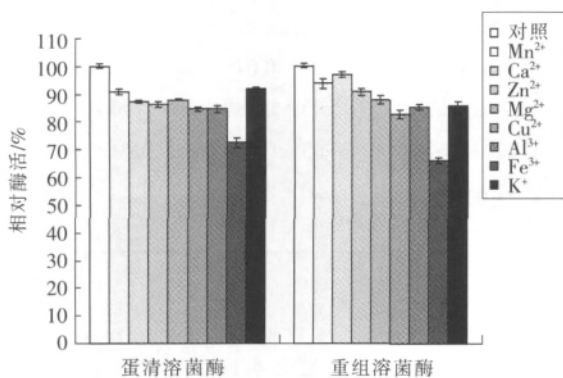


图7 金属离子对蛋清溶菌酶和重组溶菌酶的影响  
Fig.7 Effect of metal ions on activity of egg white lysozyme and recombinant lysozyme

## 2.2 蛋清溶菌酶和重组溶菌酶对小鼠肠道菌群的影响

大肠埃希菌: 与对照组相比, 两种溶菌酶组小鼠肠道内大肠埃希菌群在实验开始第 1 天差异显著 ( $P<0.05$ ), 随后蛋清溶菌酶处理组与对照组逐渐一致, 而重组溶菌酶组同对照组在各取样时间均差异显著 ( $P<0.05$ ), 且高浓度重组溶菌酶组效果更明显 ( $P<0.05$ ), 说明重组溶菌酶对大肠埃希菌群抑制作用较好。金黄色葡萄球菌: 与对照组相比, 两种溶菌酶组小鼠肠道内金黄色葡萄球菌在试验的各阶段差异均显著 ( $P<0.05$ ), 说明两种溶菌酶均对金黄色葡萄球菌抑制作用明显。粪肠球菌: 与对照组相比, 两种溶菌酶组小鼠肠道内粪肠球菌在试验各阶段差异均显著 ( $P<0.05$ ), 说明两种溶菌酶对粪肠球菌抑制作用明显。双歧杆菌: 与对照组相比, 两种溶菌酶组的小鼠肠道内容物双歧杆菌在试验第 1 天、第 7 天时差异不明显 ( $P>0.05$ ), 而在试验第 14 天、第 21 天时, 高浓度蛋清溶菌酶组和重组溶菌酶组小鼠肠道内双歧杆菌显著高于对照组 ( $P<0.05$ ), 说明随时间的延长两种溶菌酶均对双歧杆菌有促进作用, 但两种溶菌酶之间差异不明显 ( $P>0.05$ )。乳酸杆菌: 与对照组相比, 两种溶菌酶组小鼠肠道内容物乳酸杆菌在试验第 1 天时差异不明显 ( $P>0.05$ ), 7 d 后重组溶菌酶组肠道乳酸杆菌数量显著高于对照组 ( $P<0.05$ ),



21 d 时高浓度蛋清溶菌酶组和重组溶菌酶组肠道乳酸杆菌数量明显高于对照组 ( $P<0.05$ ), 但两种溶菌酶间差异不明显 ( $P>0.05$ ), 说明饲喂时间延

长, 两种溶菌酶对乳酸杆菌均有较好的促进作用。需要说明的是使用蛋清溶菌酶时添加浓度较高。

表 1 不同处理条件下小鼠肠道内容物 5 种菌群随取样时间的变化

Table 1 Number changes of five bacteria flora in the intestinal contents for the mice orally administered with egg white lysozyme and recombinant lysozyme

分组		1d	7d	14d	21d
大肠埃希菌/ lg(CFU·g <sup>-1</sup> )	对照组	6.96 ± 0.05 <sup>a</sup>	7.26 ± 0.01 <sup>a</sup>	7.49 ± 0.04 <sup>a</sup>	7.51 ± 0.03 <sup>a</sup>
	蛋清溶菌酶 组	5.66 ± 0.18 <sup>b</sup>	7.09 ± 0.03 <sup>ab</sup>	7.39 ± 0.07 <sup>a</sup>	7.51 ± 0.01 <sup>a</sup>
	蛋清溶菌酶 组	5.56 ± 0.14 <sup>b</sup>	6.79 ± 0.12 <sup>b</sup>	7.37 ± 0.04 <sup>a</sup>	7.41 ± 0.02 <sup>a</sup>
	重组溶菌酶 组	5.50 ± 0.10 <sup>b</sup>	5.66 ± 0.18 <sup>c</sup>	6.62 ± 0.10 <sup>b</sup>	6.81 ± 0.04 <sup>b</sup>
	重组溶菌酶 组	5.40 ± 0.10 <sup>b</sup>	5.50 ± 0.10 <sup>c</sup>	5.70 ± 0.20 <sup>c</sup>	6.28 ± 0.05 <sup>c</sup>
金黄色葡萄球菌/ lg(CFU·g <sup>-1</sup> )	对照组	6.42 ± 0.03 <sup>a</sup>	6.64 ± 0.05 <sup>a</sup>	6.90 ± 0.01 <sup>a</sup>	7.13 ± 0.01 <sup>a</sup>
	蛋清溶菌酶 组	5.66 ± 0.23 <sup>b</sup>	5.66 ± 0.23 <sup>b</sup>	5.96 ± 0.06 <sup>b</sup>	5.56 ± 0.14 <sup>d</sup>
	蛋清溶菌酶 组	5.56 ± 0.14 <sup>b</sup>	5.40 ± 0.10 <sup>b</sup>	5.62 ± 0.16 <sup>b</sup>	5.86 ± 0.14 <sup>cd</sup>
	重组溶菌酶 组	5.50 ± 0.10 <sup>b</sup>	5.50 ± 0.10 <sup>b</sup>	5.74 ± 0.24 <sup>b</sup>	6.31 ± 0.04 <sup>b</sup>
	重组溶菌酶 组	5.40 ± 0.10 <sup>b</sup>	5.40 ± 0.10 <sup>b</sup>	5.82 ± 0.04 <sup>b</sup>	5.96 ± 0.13 <sup>c</sup>
粪肠球菌/ lg(CFU·g <sup>-1</sup> )	对照组	7.40 ± 0.04 <sup>a</sup>	7.61 ± 0.01 <sup>a</sup>	7.80 ± 0.02 <sup>a</sup>	7.82 ± 0.03 <sup>a</sup>
	蛋清溶菌酶 组	6.91 ± 0.04 <sup>b</sup>	7.31 ± 0.01 <sup>b</sup>	7.36 ± 0.01 <sup>b</sup>	7.37 ± 0.03 <sup>b</sup>
	蛋清溶菌酶 组	6.68 ± 0.01 <sup>c</sup>	7.42 ± 0.08 <sup>b</sup>	7.26 ± 0.06 <sup>bc</sup>	7.39 ± 0.04 <sup>b</sup>
	重组溶菌酶 组	5.85 ± 0.07 <sup>d</sup>	5.96 ± 0.06 <sup>c</sup>	7.18 ± 0.05 <sup>c</sup>	7.24 ± 0.01 <sup>c</sup>
	重组溶菌酶 组	5.66 ± 0.06 <sup>c</sup>	6.02 ± 0.03 <sup>c</sup>	6.70 ± 0.05 <sup>d</sup>	7.10 ± 0.02 <sup>d</sup>
双歧杆菌/ lg(CFU·g <sup>-1</sup> )	对照组	7.20 ± 0.05 <sup>a</sup>	7.36 ± 0.04 <sup>a</sup>	7.42 ± 0.04 <sup>a</sup>	7.46 ± 0.01 <sup>a</sup>
	蛋清溶菌酶 组	7.25 ± 0.07 <sup>a</sup>	7.36 ± 0.02 <sup>a</sup>	7.55 ± 0.02 <sup>ab</sup>	7.50 ± 0.01 <sup>a</sup>
	蛋清溶菌酶 组	7.30 ± 0.07 <sup>a</sup>	7.43 ± 0.03 <sup>a</sup>	7.71 ± 0.02 <sup>b</sup>	7.72 ± 0.01 <sup>bc</sup>
	重组溶菌酶 组	7.32 ± 0.03 <sup>a</sup>	7.39 ± 0.09 <sup>a</sup>	7.63 ± 0.02 <sup>b</sup>	7.69 ± 0.01 <sup>bc</sup>
	重组溶菌酶 组	7.22 ± 0.05 <sup>a</sup>	7.44 ± 0.08 <sup>a</sup>	7.72 ± 0.01 <sup>b</sup>	7.85 ± 0.01 <sup>c</sup>
乳酸杆菌/ lg(CFU·g <sup>-1</sup> )	对照组	6.36 ± 0.09 <sup>a</sup>	7.02 ± 0.01 <sup>a</sup>	7.07 ± 0.04 <sup>a</sup>	7.05 ± 0.05 <sup>a</sup>
	蛋清溶菌酶 组	6.43 ± 0.07 <sup>a</sup>	6.97 ± 0.03 <sup>a</sup>	6.95 ± 0.03 <sup>a</sup>	7.10 ± 0.05 <sup>a</sup>
	蛋清溶菌酶 组	6.46 ± 0.04 <sup>a</sup>	7.06 ± 0.02 <sup>a</sup>	7.03 ± 0.03 <sup>a</sup>	7.20 ± 0.03 <sup>ab</sup>
	重组溶菌酶 组	6.40 ± 0.03 <sup>a</sup>	7.12 ± 0.04 <sup>ab</sup>	7.20 ± 0.04 <sup>b</sup>	7.23 ± 0.03 <sup>b</sup>
	重组溶菌酶 组	6.43 ± 0.02 <sup>a</sup>	7.21 ± 0.01 <sup>b</sup>	7.28 ± 0.04 <sup>b</sup>	7.26 ± 0.02 <sup>b</sup>

注: 同列不同字母说明差异显著 ( $P<0.05$ )。

### 2.3 蛋清溶菌酶和细菌溶菌酶对小鼠部分血清生化指标的影响

总蛋白: 与对照组相比, 21 d 时试验组总蛋白含量均有一定程度的提高, 其中重组溶菌酶 组与对照组差异显著 ( $P<0.05$ )。尿素氮: 与对照组相比, 14 d 时重组溶菌酶 组小鼠血清尿素氮含量

明显降低; 21 d 时除蛋清溶菌酶 组外, 各试验组小鼠血清尿素氮含量均显著降低 ( $P<0.05$ )。甘油三酯: 与对照组相比, 整个实验期间各组甘油三酯含量均无显著差异 ( $P>0.05$ )。胆固醇: 与对照组相比, 口服溶菌酶组小鼠血清胆固醇随实验时间的延长呈下降趋势, 其中 21 d 时各组胆固醇含量下

降明显 ( $P<0.05$ ), 但各处理组间无显著差异 ( $P>0.05$ )。该结果表明, 两种溶菌酶均能提高血清总蛋白含量, 降低尿素氮、胆固醇含量, 其中重组溶

菌酶 (5 000 U/mL) 饲喂 21 d 后血清总蛋白、尿素氮、胆固醇与对照组差异显著 ( $P<0.05$ )。

表 2 不同处理条件下小鼠血清生化指标随取样时间的变化  
Table 1 Changes of biochemical indicator in the serum for the mice orally administered with egg white lysozyme and recombinant lysozyme

分组		1d	7d	14d	21d
总蛋白/ g·L <sup>-1</sup>	对照组	57.52 ± 0.24 <sup>a</sup>	57.44 ± 0.27 <sup>a</sup>	57.77 ± 0.05 <sup>a</sup>	57.82 ± 0.08 <sup>a</sup>
	蛋清溶菌酶 组	57.81 ± 1.51 <sup>a</sup>	57.70 ± 0.08 <sup>a</sup>	58.20 ± 0.15 <sup>a</sup>	58.41 ± 0.15 <sup>ab</sup>
	蛋清溶菌酶 组	57.83 ± 1.73 <sup>a</sup>	58.11 ± 0.57 <sup>a</sup>	58.74 ± 0.53 <sup>ab</sup>	58.85 ± 0.15 <sup>ab</sup>
	重组溶菌酶 组	57.19 ± 0.83 <sup>a</sup>	57.85 ± 0.16 <sup>a</sup>	58.02 ± 0.09 <sup>a</sup>	58.58 ± 0.24 <sup>ab</sup>
	重组溶菌酶 组	57.80 ± 0.19 <sup>a</sup>	58.21 ± 0.98 <sup>a</sup>	59.47 ± 0.35 <sup>b</sup>	59.23 ± 0.15 <sup>b</sup>
尿素氮/ mmol·L <sup>-1</sup>	对照组	14.36 ± 0.08 <sup>a</sup>	14.21 ± 0.45 <sup>a</sup>	14.41 ± 0.05 <sup>a</sup>	14.46 ± 0.20 <sup>a</sup>
	蛋清溶菌酶 组	14.43 ± 0.12 <sup>a</sup>	13.99 ± 0.14 <sup>a</sup>	14.28 ± 0.23 <sup>a</sup>	13.91 ± 0.13 <sup>ab</sup>
	蛋清溶菌酶 组	14.35 ± 0.16 <sup>a</sup>	13.63 ± 0.02 <sup>a</sup>	13.97 ± 0.45 <sup>ab</sup>	13.41 ± 0.32 <sup>b</sup>
	重组溶菌酶 组	14.55 ± 0.11 <sup>a</sup>	13.86 ± 0.06 <sup>a</sup>	14.01 ± 0.27 <sup>ab</sup>	13.48 ± 0.31 <sup>b</sup>
	重组溶菌酶 组	14.38 ± 0.09 <sup>a</sup>	13.71 ± 0.14 <sup>a</sup>	13.72 ± 0.06 <sup>b</sup>	13.38 ± 0.22 <sup>b</sup>
甘油三酯/ mmol·L <sup>-1</sup>	对照组	1.28 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.33 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.32 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.30 ± 0.02 <sup>a</sup>
	蛋清溶菌酶 组	1.30 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.31 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.30 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.28 ± 0.04 <sup>a</sup>
	蛋清溶菌酶 组	1.27 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.24 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.25 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.24 ± 0.10 <sup>a</sup>
	重组溶菌酶 组	1.23 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.31 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.30 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.30 ± 0.01 <sup>a</sup>
	重组溶菌酶 组	1.32 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.29 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.28 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.26 ± 0.04 <sup>a</sup>
胆固醇/ mmol·L <sup>-1</sup>	对照组	2.53 ± 0.01 <sup>a</sup>	2.55 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.59 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.58 ± 0.01 <sup>a</sup>
	蛋清溶菌酶 组	2.53 ± 0.15 <sup>a</sup>	2.43 ± 0.03 <sup>ab</sup>	2.32 ± 0.02 <sup>b</sup>	2.30 ± 0.02 <sup>b</sup>
	蛋清溶菌酶 组	2.50 ± 0.21 <sup>a</sup>	2.46 ± 0.18 <sup>ab</sup>	2.31 ± 0.07 <sup>b</sup>	2.26 ± 0.04 <sup>b</sup>
	重组溶菌酶 组	2.54 ± 0.20 <sup>a</sup>	2.46 ± 0.18 <sup>ab</sup>	2.42 ± 0.03 <sup>ab</sup>	2.36 ± 0.03 <sup>b</sup>
	重组溶菌酶 组	2.50 ± 0.12 <sup>a</sup>	2.40 ± 0.08 <sup>b</sup>	2.39 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.34 ± 0.12 <sup>b</sup>

注: 同列不同字母说明差异显著 ( $P<0.05$ )。

3 讨论

目前, 关于蛋清溶菌酶的研究很多, 而关于重组溶菌酶的报道较少。本试验中蛋清溶菌酶酶学性质与文献报道的基本一致<sup>[13]</sup>, 但重组溶菌酶最适温度 45 ℃, 最适 pH 6.0, 其中最适温度稍高于蛋清溶菌酶。重组溶菌酶热稳定性略优于蛋清溶菌酶, 但两种溶菌酶在温度高于 50 ℃时活性均迅速下降, 故溶菌酶制剂应避免高温处理。两种溶菌酶在碱性条件下均较稳定, 在酸性环境下酶活受影响较大, 这与溶菌酶使用中多配成 pH 大于 6.0 的溶液的报道基本一致<sup>[14]</sup>。蛋清溶菌酶在胃液、肠

液中易失活; 重组溶菌酶在胃液中易失活, 而在肠液中稳定性好。鉴于两种溶菌酶在消化道内均易于受胃液、肠液的影响, 使用微胶囊等保护技术可以有效保证其高酶活性, 使其顺利通过胃而至小肠发挥作用<sup>[15-16]</sup>。Fe<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>均不同程度地抑制两种溶菌酶的酶活, 因此在使用过程中应尽量减少溶菌酶与金属离子的直接接触。

肠道菌群指人体或动物肠道存在的大量细菌, 随宿主自身、饮食和环境因素的改变而变化, 肠道菌群平衡稳定是保障机体健康的必要条件<sup>[17]</sup>。

大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和粪肠球菌是肠道条件致病菌,双歧杆菌、乳酸杆菌是肠道重要有益菌,它们数量的变化是肠道健康的重要指标<sup>[18]</sup>。本试验中通过小鼠口服溶菌酶溶液,探讨两种溶菌酶对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、双歧杆菌和乳酸杆菌为代表的有害、有益肠道菌群的调节效果。试验结果表明,两种溶菌酶在一定程度上降低粪肠球菌、金黄色葡萄球菌数量,提高双歧杆菌和乳酸杆菌数量。重组溶菌酶对大肠埃希菌的抑制作用明显,而蛋清溶菌酶对大肠埃希菌群作用不明显。分析原因,可能与两种溶菌酶的体外抑菌能力有关。有报道称两种溶菌酶对革兰氏阳性菌抑制作用较强,但蛋清溶菌酶对革兰氏阴性菌作用不明显,而重组溶菌酶有较好的革兰氏阴性菌抑制效果<sup>[19]</sup>。另据报道,溶菌酶对双歧杆菌和乳酸杆菌不具有抑制作用,在抑制有害菌的情况下,有利于双歧杆菌的生长,这同本试验的结果基本一致<sup>[20]</sup>。

血清生化是直接反映机体生理状况的指标,其中总蛋白是血清中各种蛋白质的总称,反映机体健康状况和对蛋白质吸收情况<sup>[21]</sup>;尿素氮源于氨基酸分解和转化,反映机体蛋白质代谢和氨基酸平衡状况<sup>[22]</sup>;胆固醇、甘油三酯是血清中的主要脂质,其在血清中的含量影响机体健康<sup>[23]</sup>。与对照组相比,本实验中两种溶菌酶能均提高血清总蛋白含量,降低尿素氮、胆固醇含量,但仅重组溶菌酶饲喂 21 d 后各指标与对照组差异显著,说明溶菌酶能够在一定程度上促进机体对蛋白质的吸收,降低蛋白质分解,调节胆固醇代谢,但需要较大剂量和较长时间的使用才会有明显的效果。

综上所述,蛋清溶菌酶、重组溶菌酶作为功能食品添加剂不仅可有效防止食品腐败变质,而且还一定程度上起到调节机体肠道菌群平衡,改善机体代谢的作用,但在使用过程中需要注意温度、pH、金属离子、胃液肠液等因素的影响。

## 参 考 文 献

- [1] Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principles of biochemistry[M]. 2<sup>nd</sup> Edition. New York: Worth Publishers, 1993: 180-312.
- [2] 李永富,孙震,史锋,等. 溶菌酶对猪肉的保鲜作用[J]. 上海农业学报, 2009, 25(4): 61-63.
- [3] 顾仁勇. Nisin、溶菌酶用于斑点叉尾鲴鱼片保鲜的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(14): 305-308.
- [4] 庞莉. 阿魏酸化学修饰溶菌酶及扩展抑菌谱的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009: 35-41.
- [5] Tenovuo J. Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety[J]. Oral Dis, 2002, 8(1): 23-29.
- [6] 肖怀秋,林亲录,李玉珍,等. 溶菌酶及其在食品工业中的应用[J]. 中国食物与营养, 2005, 2: 32-34.
- [7] 叶丹,连宾. 溶菌酶及其应用[J]. 贵州科学, 2003, 21(3): 67-70.
- [8] 邹艳丽,孙谧,王跃军. 海洋微生物溶菌酶的纯化与性质研究[J]. 生物工程学报, 2005, 21(3): 420-424.
- [9] 沈悦,李国才. 重组人溶菌酶的鉴定及其抑菌活性的研究[J]. 实用临床医药杂志, 2007, 11(3): 75-76.
- [10] 王秀霞,丛丽娜,王丹等. 海刺参 i 型溶菌酶基因的重组表达及抑菌谱分析[J]. 生物工程学报, 2009, 25(2): 189-194.
- [11] Shaoyun Wang, Tzi Bun Ng, Tianbao Chen, et al. First report of a novel plant lysozyme with both antifungal and antibacterial activities[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 327(3): 820-827.
- [12] 侯启瑞,王金玉,谢凯舟,等. 测定鸡蛋蛋清中溶菌酶含量和活力标准方法的建立[J]. 动物生产, 2010, 46(3): 49-52.
- [13] 余海芬. 蛋清中溶菌酶的高效提取及其定量测定方法研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010: 55-64.
- [14] 刘慧,王凤山,楚杰. 蛋清溶菌酶部分酶学性质及酶活性的影响因素研究[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(6): 385-391.
- [15] 田应娟,朱良,李琳,等. 微胶囊技术在功能食品应用中的研究进展[J]. 食品工业科技, 2010, 31(12): 358-365.
- [16] 孙建平,姜子涛,李荣. 纳米微胶囊技术及其在食品中的应用[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(5): 184-187.

- [17] Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut[J]. Science, 2001, 292: 1115-1118
- [18] Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, et al. Overview of gut flora and probiotics[J]. Int J Food Microbiol, 1998, 41: 85-101
- [19] 马正智, 胡国华, 方国生. 我国溶菌酶的研究与应用进展[J]. 中国食品添加剂, 2007, (2): 177-182.
- [20] 李述日, 吴清平, 吴军林. 利用细菌开发天然功能性食品添加剂研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(2): 425-430.
- [21] 陈亚军, 齐玉梅. 精氨酸免疫营养作用的研究进展[J]. 中国临床营养杂志, 2007, 15(5): 310-314.
- [22] 陈亮, 陈五岭, 李俊玲. 食源性生物活性肽抗小鼠运动性疲劳的研究[J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2011, 32(3): 67-69.
- [23] 宋秀霞, 姜涛, 庄惠. 中心性肥胖与心血管病危险因素聚集相关性研究[J]. 中国医刊, 2008, 43(12): 44.

## The Enzymatic Properties of Two Kinds Lysozyme and Their Effects on the Intestinal Flora and Serum Biochemical Indicators of Mice

Tian Hongyuan Liu Mingqi Dai Xianjun\*

(College of Life Science, China Jiliang University, Hangzhou 310018)

**Abstract** Objective: The enzymatic properties were studied to determine the optimum condition of activity for egg white lysozyme extracted from the eggs and recombinant lysozyme expressed from the *Pichia pastoris* including human lysozyme gene. The intestinal *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* were cultured, and serum biochemical indicators were determined for the mice orally administered with two lysozymes. Methods: Based on the turbidimetry value of micrococcus, lysozyme activity was determined under different reaction conditions(temperature, pH value, artificial gastric and bowel liquid, and common metal ions); Mice were orally administered with the lysozymes through drinking water including the egg white lysozyme and recombinant lysozyme of 2 500 and 5 000 U/mL. The serum were collected to determinate the concentration of total protein, urea nitrogen, triglyceride and cholesterol through picking eye ball of the mice at the experimental time of 1,7,14, 21 days, then the mice were slaughtered for the intestinal contents taken out in sterile environment to culture the *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*. Results: Egg white lysozyme exhibited the optimal temperature was 40 °C, and the optimal pH value was 6.0; Recombinant lysozyme exhibited the optimal temperature was 45 °C, and the optimal pH value was 6.0. Both lysozyme activity would decline rapidly above 50 °C, but keep high in the different pH6~9 conditions. Their activities would decline rapidly when both lysozyme were kept in artificial gastric and bowel liquid, only recombinant lysozyme would contain 44.85% activity in artificial bowel liquid after 120 min; The Fe<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> ions could restrain the lysozyme activity which had no significant difference between two lysozymes( $P>0.05$ ). Compared with control group, both lysozyme can restrain the growth of intestinal *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*, but promote the growth of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* in the later experimental time; Only recombinant lysozyme had obvious inhibitory effect against *Escherichia coli*( $P<0.05$ ). Two lysozymes can increase total protein concentration and reduce urea nitrogen and cholesterol concentration for the mice orally administered with two lysozymes, but only above three serum biochemical indicators of recombinant lysozyme group (5 000 U/mL) showed significant difference( $P<0.05$ ) at the experimental time of 21 day. Conclusion: Both lysozymes could regulate the intestinal flora and affect serum biochemical indicators, and the effect of recombinant lysozyme on serum biochemical indicators was more obvious than that of egg white lysozyme for the mice. It should be considered how to control the conditions of temperature, pH value, artificial gastric and bowel liquid, and metal ions when two lysozyme were added into the foods as an additive.

**Key words** egg white lysozyme; recombinant human lysozyme; enzymatic properties; intestinal flora; serum biochemical indicators