

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※

※ 加工處理對以腸出血性大腸桿菌免疫處理雞 ※

※ 所產雞蛋蛋黃中抗體安定性之影響 ※

※ ※

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC89-2313-B-002-173

執行期間：89年8月1日至 90年7月31日

計畫主持人：蘇和平

共同主持人：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學畜產學系

中華民國 91年 1月 3日

加工處理對以腸出血性大腸桿菌免疫處理雞所產雞蛋
蛋黃中抗體安定性之影響

Effect of Processing Treatments on the Stability of Chicken Egg Yolk Antibodies

計畫編號：NSC89-2313-B-002-173

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：蘇和平 國立台灣大學畜產學系

E-mail：suhp@ccms.ntu.edu.tw

一、中英文摘要

Abstract

本研究目的在於探討以腸出血性大腸菌 (*Escherichia coli* O157:H7) (CCRC 13095) 為抗原，對 Isa 母雞行皮下注射，並進行免疫期間雞蛋蛋黃中 IgY 對腸出血性大腸桿菌抗體力價變化之測定。同時進行不同加工處理對蛋黃中 IgY 安定性影響之探討，期能了解免疫雞蛋供進一步加工之可行性。實驗中以酸、鹼、酒精、食鹽及加熱等五種加工處理市售雞蛋，結果顯示酸 (pH2.73) 處理殼蛋 48 小時，蛋黃中 IgY 已喪失 99%；鹼 (4.2% w/w 氫氧化鈉) 處理 14 天或飽和食鹽水 (36.5% w/w) 處理 28 天，可保留蛋黃中 IgY 24~33%；而以酒精 (16% v/v) 處理 4 天或加熱 (90°C, 5min) 處理成溏心蛋，則可將蛋黃中 IgY 保留 47% 以上。再以不同加熱條件處理免疫雞蛋，顯示只要蛋黃溫度低於 70°C，蛋黃中 IgY 可保存 21~81% 對腸出血性大腸桿菌的結合能力。在貯存試驗方面，殼蛋新鮮度與蛋黃中 IgY 含量無關。但 IgY 對腸出血性大腸桿菌之結合能力，則隨新鮮度下降而減少。最後比較兩種不同品種及免疫前後母雞所生產之雞蛋中 IgY 之總胺基酸及等電點，結果顯示胺基酸組成差異不大，而等電點皆為 4.75。

關鍵詞：蛋黃抗體、加工處理、免疫雞蛋、腸出血性大腸桿菌

Effects of various processing treatments on stability of IgY from chicken egg yolk were studied to evaluate the feasibility of producing the specific IgY-containing immune egg products. The normal market chicken shelled eggs were treated under five different conditions including acidic, alkaline, alcoholic, salt and heat. As the result showed, 99% of the contents of IgY in egg yolk was lost after 48 hours in acidic treatment. However, egg yolk retained 24~33% IgY after 14 days in alkaline or 28 days in salt treatments. IgY also retained more 47% after 4 days in alcoholic treatment or in the mild heat treatment which kept yolk core in a viscous status. The antigen binding activity of IgY from *E. coli* O157: H7-immunized egg yolk still contained 21~81% when we used the mild heat treatment, which kept the temperature off egg yolk below 70°C.

Key words: egg yolk, antibody, Processing condition, Immune-eggs, Enterohemorrhagic *E.coli*

二、計畫緣由與目的

家禽經由卵巢上皮細胞，可將血液中之 IgY 移行至蛋黃中，以便在雞雞本身免疫系統尚未建立前，提供立即性的全身免疫，此種抗體稱為移行抗體。為應用這種移行抗體之作用，以各種抗原如細菌、病毒、蛋白質等，對產蛋雞進行免疫接種，即可產生相對於抗原而具專一性之蛋黃抗體 (IgY)。許多文獻指出利用此種專一性

之抗體，以口服被動免疫方式，可以預防病毒性下痢、家畜大腸菌性下痢及養殖魚傳染病 (Ebina *et al.*, 1990; Hatta *et al.*, 1991; Yokoyama *et al.*, 1992) 等。以每克蛋黃中 IgY 含量為 9~25mg (Rose *et al.*, 1974; Wang *et al.*, 1986) 來計算，每隻產蛋雞年平均約可生產 30~90g 的 IgY。

由於至今仍未開發出既符合經濟效益又可大量純化蛋黃中 IgY 的方法，故考慮直接食用含專一性抗體之免疫雞蛋來達到口服被動免疫的效果，不但節省分離純化的費用，亦可促進本省雞蛋的消費。直接食用免疫雞蛋至少先需考慮兩個問題，及加工處理及消化作用對蛋黃中 IgY 安定性之影響。本研究擬針對第一部份，先以腸出血性大腸桿菌為抗原，用胰化酪蛋白大豆培養液活化菌體後，以 1% (w/v) 福馬林處理 48 小時，再以無菌水清洗菌體兩次，最後將菌體重新懸浮於無菌水中。取等體積菌液及弗氏完全佐劑製成抗原乳化液，對 Isa 母雞行皮下注射，使所生產之雞蛋蛋黃中產生 IgY 抗體供進一步試驗。首先探討雞蛋經五種不同加工處理後，對蛋黃中 IgY 安定性之影響，並進一步比較兩種不同品種及免疫前後母雞所生產之雞蛋蛋黃中 IgY 之差異，及比較不同貯存溫度、時間對蛋黃中 IgY 含量及抗原結合能力之影響，期能做為日後免疫雞蛋加工應用之依據。

三、結果與討論

(一)酸處理

將市售雞蛋浸漬於醋酸溶液(pH 2.73)中 48 小時並觀察浸漬期間蛋黃中 IgY 含量之變化(圖 1)。結果顯示在上述條件浸漬 48 小時後，蛋黃中蛋黃 pH 值由 6.2 下降至 5.3，而蛋黃中 IgY 的含量在浸漬 12 小時後由 11.86mg/g 減少至 2.68mg/g。

由以上結果發現，酸處理明顯影響蛋黃中 IgY 分子安定性，在 48 小時內即可導致蛋黃中 IgY 含量迅速下降為原來的 0.17%，故不適合免疫雞蛋的加工。

(二)鹼處理

將市售雞蛋浸漬於 4.2% 氫氧化鈉(pH 13.5)溶液 28 天，並觀察浸漬期間蛋黃中 IgY 含量之變化(圖 2)。結果顯示隨浸漬時間增加，蛋黃 pH 值漸漸上升(pH 6.2→10.3)，且在第二週上升最快，此時蛋黃外觀亦由黃色轉變為青綠色。第三週後上升速度則趨於平緩。至於蛋黃中 IgY 含量，在浸漬第二週隨 pH 值上升大幅減少了 76%。

鹼處理蛋殼 28 天後，蛋黃中 IgY 已喪失大部分。而雞蛋皮蛋的凝膠化需 12~14 天，鹼處理 14 天後。蛋黃中 IgY 仍保留 24.2%。

(三)酒精處理

本實驗分成兩組，一組雞蛋先經過水煮成溏心蛋，即蛋白全熟而蛋黃仍保持液態之蛋，再與另一組未經水煮之雞蛋同浸漬於 16% 之酒精中，並分別觀察浸漬期間兩組蛋黃中之 IgY 含量變化(圖 3)。由於溏心蛋之蛋白質已經凝固，會阻礙酒精的通透，故溏心蛋蛋黃的酒精濃度會較生蛋黃為低，上升速度亦較慢。在 IgY 含量方面，先經加熱的溏心蛋，蛋黃中 IgY 分子已受高溫破壞而降低至 1.1mg/g。但比較兩組 6~8 天間的數據，溏心蛋蛋黃及生蛋黃的酒精濃度分別上升了 0.24 及 0.23%，IgY 的含量則分別下降了 0.25 及 0.23%，故得知雖然最後蛋黃中的酒精濃度不同，但在相同浸漬期間內，酒精濃度增加比例相同，蛋黃中 IgY 損失亦相同。

酒精處理對蛋黃中 IgY 的影響較鹼處理嚴重，8 天內，蛋黃中 IgY 只剩下原來的 29.4%。但實際上酒蛋的製作是先水煮成溏心蛋，在浸漬於紹興酒 3 天，對照酒精水煮組之數據，水煮後浸漬 3 天內，蛋黃中 IgY 只損失 20~30%，若能搭配溏心蛋水煮條件中 IgY 損失最少的，則以免疫雞蛋為原料，來製作酒蛋仍具可行性。

(四)食鹽處理

將市售雞蛋浸漬於飽和食鹽水(食鹽濃度 36.5%)28 天，並觀察浸漬期間蛋黃中 IgY 含量之變化(圖 4)。浸漬結束後，蛋黃食鹽濃度為 1.1%。而隨著蛋黃中食鹽濃度

的上升，IgY 含量漸漸減少，未經水煮之蛋黃於 28 天後仍保留 3.94 mg/g 的 IgY，水煮後 IgY 僅存 0.71 μ g/g。

鹽處理雖對蛋黃中 IgY 含量影響最小，浸漬 28 天後仍保留原來含量的 32.2%，但鹹蛋浸漬後的水煮步驟，會導致蛋黃中 IgY 分子大部分變性，故亦不適合免疫雞蛋的加工。

(五)熱處理

本實驗分別以七種不同溫度水煮市售及免疫雞蛋 5、10、15、20、25 及 30 分鐘，並觀察不同加熱條件對蛋黃中 IgY 含量之變化(圖 5)。結果顯示以 100、95 及 90°C 水煮 5 分鐘，蛋黃中心溫度皆在 70°C 以下，且蛋黃中 IgY 含量皆保留原來的 50% 以上。而以 85 及 80°C 水煮 10 分鐘、75°C 水煮 15 分鐘或 70°C 水煮 20 分鐘亦可獲得類似結果。若蛋黃中心溫度超過 70°C 則蛋黃中 IgY 含量急遽下降。

至於免疫雞蛋蛋黃中 IgY 對腸出血性大腸桿菌結合能力之變化(圖 6)。於 100°C 水煮 5 分鐘，蛋黃中 IgY 仍有 81.3% 會與腸出血性大腸桿菌膜外蛋白質反應。於 75~95°C 水煮 10 分鐘，則可保有 59.6~66.4% 抗原結合能力。於 80、85°C 水煮 15 分鐘或 75°C 水煮 20 分鐘，則保有 20% 以上之抗原結合能力。而於 70°C 水煮免疫雞蛋直到 25 分鐘，抗原結合能力仍保有 53.7%。

綜合以上結果發現，加熱對蛋黃中 IgY 分子安定性之影響最大，但只要控制加熱條件，使得蛋黃仍具流動性，即可保留蛋黃中一半以上的 IgY。

四、計畫成果自評

家禽經由卵巢上皮細胞，可將血液中之 IgY 移行至蛋黃中，以便在雛雞本身免疫系統尚未建立前，提供立即性的全身免疫，此種抗體稱為移行抗體。為應用這種移行抗體之作用，以各種抗原如細菌、病毒、蛋白質等，對產蛋雞進行免疫接種，即可產生相對於抗原而具專一性之蛋黃抗體 (IgY)。許多文獻指出利用此種專一性之抗體，以口服被動免疫方式，可以預防病毒性下痢、家畜大腸菌性下痢及養殖魚

傳染病 (Ebina *et al.*, 1990; Hatta *et al.*, 1991; Yokoyama *et al.*, 1992) 等。本年計劃已達到預期目標，完成免疫雞蛋生產之模式及加工處理對蛋黃中 IgY 安定性之影響，將來有機會可朝向食用後免疫雞蛋之功效加以評估，以提高雞蛋附加價值。

五、主要參考文獻

1. Akita, E. M. and S. Nakai. 1992. Immunoglobulins from egg yolk: Isolation and purification. *J. Food Sci.* 57: 629~634.
2. A. O. A. C. 1992. Official Methods of Analysis Association of Official Analytical Chemist. Washington, D. C.
3. Hatta, H., K. Mabe, M. Kim, T. Yamamoto, M. A. Gutierrez and T. Miyazaki. 1994. Prevention of fish disease using egg yolk antibody. In: J. S. Sim and A. Nakai (Ed.). *Egg Uses and Processing Technologies New Developments.* pp. 241~249. CAB International. U. K.
4. O'farrelly, C., D. Branton and C. A. Wanke. 1992. Oral ingestion of egg yolk immunoglobulin from hens immunized with an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain prevents diarrhea in rabbits challenged with the same strain. *Intect. Immun.* 60: 2593~2597.

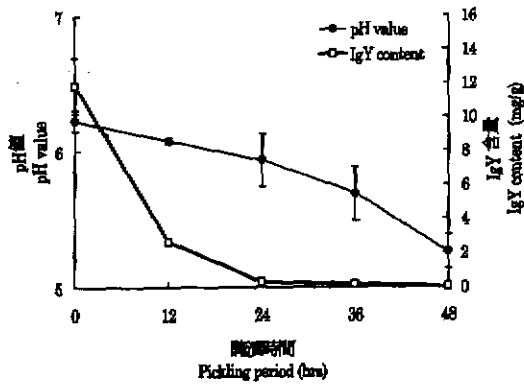


圖 1. 酸處理期間蛋黃 pH 值及 IgY 含量之變化。
Fig. 1. Changes of pH value and IgY content of egg yolk during acidic treatment (n = 5).

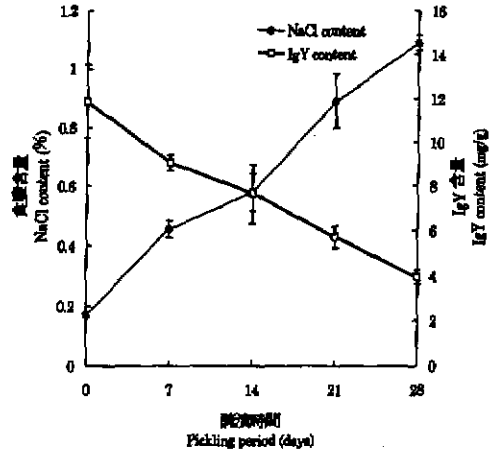


圖 4. 食鹽處理期間蛋黃中食鹽及 IgY 含量之變化。
Fig. 4. Changes of NaCl and IgY content of shelled egg yolk during salt treatment (n = 5).

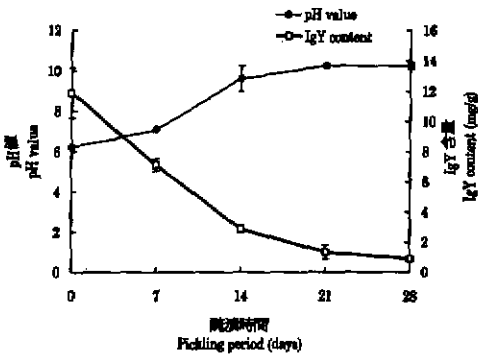


圖 2. 鹼處理期間蛋黃 pH 值及 IgY 含量之變化。
Fig. 2. Changes of pH value and IgY content of egg yolk during alkaline treatment (n = 5).

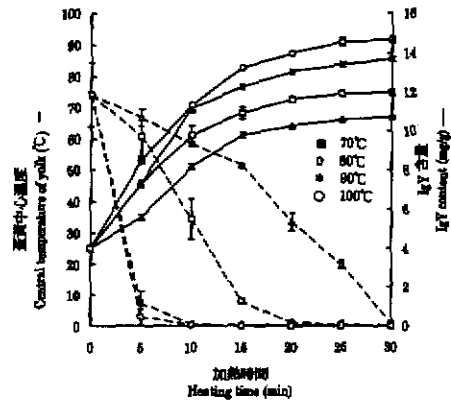


圖 5. 加熱處理期間蛋黃中心溫度及 IgY 含量之變化。
Fig. 5. Changes of central temperature and IgY content of egg yolk from chicken eggs during heat treatments (n = 5).

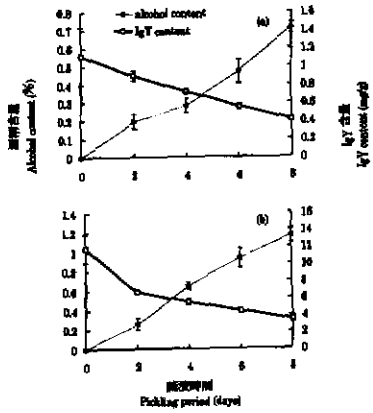


圖 3. 酒精處理期間蛋黃中酒精及 IgY 含量之變化。
(a) 以 90 °C、6 分鐘之酒精處理。(b) 未加酒精處理。
Fig. 3. Changes of alcohol and IgY content of shelled egg yolk during alcoholic treatment (n = 5).
(a) cooked for 6 minutes at 90 °C. (b) uncooked.

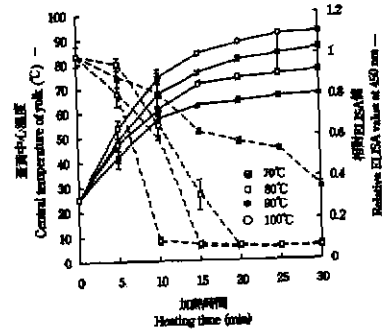


圖 6. 加熱處理期間蛋黃中心溫度及 IgY 對腸出血性大腸桿菌 (O157:H7) 結合能力之變化。
Fig. 6. Changes of central temperature and antigen binding activity of yolk IgY from E. coli O157:H7-immunized chicken eggs during heat treatments (n = 3).