

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

牛乳免疫球蛋白 G 分子安定性之研究

Studies on Cow Milk Immunoglobulin G Molecular Stability

計畫編號: NSC 88-2313-B-041-007

執行期限: 自民國 87 年 8 月 1 日起至民國 88 年 7 月 31 日
主持人: 陳昭誠 執行機構及單位: 嘉南藥理學院食品衛生系

一、中文摘要

利用口服方式攝入免疫球蛋白(被動免疫方式之一種)以增強人體之免疫力已為多數學者所報導,研究結果發現可抑制腸毒型大腸桿菌(*Escherichia coli*)與輪狀病毒(rotavirus)的感染,以避免下痢發生,因此建議在嬰兒乳粉中添加免疫球蛋白以預防感染病菌。

本研究擬以一般牛初乳分離精製牛乳免疫球蛋白 G(IgG),並購得雞血清 IgG 及取得免疫雞蛋中 IgY 為實驗材料,一併探討比較其免疫球蛋白 G 分子在不同蛋白質變性劑作用下、加熱與冷藏冷凍下、與不同飽和程度的脂肪酸及不同保護劑共存等條件下,鹽類之種類與濃度、溫度變化、脂肪氧化程度及保護劑種類等因素對免疫球蛋白 G 分子安定性之影響。結果發現在 3.0 M Gdn-HCl 和 1.0 M 鹽類共存下對牛乳 IgG 和雞血清 IgG 作用中,所得相對螢光強度值以在 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 中最低。另外,在相同 Gdn-HCl 濃度下,在 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度較高時則有較低的相對螢光強度值,此說明 IgG 分子因為 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度增高而增加其分子結構的安定性, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的存在對牛乳 IgG 和雞血清 IgG 分子有保護的效果。而有關冷凍解凍和加熱處理對牛乳或雞血清 IgG 安定性之影響,結果顯示在冷凍解凍部份,未加甘油保護之 IgG,其活性隨冷凍解凍次數增加而逐漸降低,相對地有添加甘油時,冷凍解凍次數的多寡對

IgG 活性影響不明顯。不同脂肪酸、包裝處理及脫氣處理對儲存中 IgG 安定性之影響,結果顯示未經脫氣處理之透光包裝之 IgG 樣品,由於不飽和脂肪酸氧化影響 IgG 活性,因此殘存的 IgG 活性最低,可確定不飽和脂肪酸氧化程度對 IgG 分子結構造成相當影響,致使 IgG 的免疫活性降低。

關鍵詞: 牛乳、免疫球蛋白 G、IgG、IgY、分子安定性

二、英文摘要

The enhancement of immunity against diseases by oral administration of antibodies to avoid diarrhea have been reported to be effective in preventing the infection of enterotoxigenic *Escherichia coli* and rotavirus. Thus, suggestions have been made to fortify the immunity of young children by adding the immunoglobulins to the infant formulate.

Using colostrum to separated milk IgG, and market chicken serum IgG and immuned chicken egg IgY to be experimental sample. Result showed that compared with the other salts used, it was found that the relative fluorescence (%) of IgG was lowered most remarkably in the presence of 1.0 M ammonium sulfate when 3.0 M Gdn-HCl was used as protein denaturant. Under the same level of Gdn-HCl, the

increased concentration of ammonium sulfate lowered relatively the relative fluorescence of IgG. Such results indicated that ammonium sulfate was effective in enhancing the molecular stability of IgG and in protecting IgG molecules from denaturation.

Keywords : Milk、Immunoglobulin G、IgG、IgY、Molecular Stability

三、緣由與目的

許多研究結果證實，以母乳哺育較使用嬰兒配方乳粉不易感染下痢，經免疫處理之牛初乳免疫球蛋白可抑制人體 *E. coli* 及輪狀病毒感染，避免下痢^(1,2)，建議將牛乳免疫球蛋白加入在嬰兒配方乳粉或機能性食品中，以增進其免疫功能。本人在博士論文研究期間，針對牛乳 IgG 安定性研究，結果得知牛乳 IgG 在高溫加熱、強酸強鹼及酵素作用下極易失活；在加工上，為了方便使用常以瞬間超高溫殺菌(UHT)製得鮮乳或以高溫噴霧乾燥法製成乳粉，發現亦會大量減少其活性；在口服攝取上，由於胃酸與酵素作用亦會使其失活，以上種種因素均會影響牛乳 IgG 之免疫活性。保護劑使用上，發現醣類及蛋白質均可增進 IgG 的活性保存，至於脂肪部份，懷疑脂肪酸的組成及飽和度會影響脂肪氧化程度，連同共存之 IgG 也受到影響，因此想進一步探討；為了保留更多牛乳中具有免疫活性的成分，實在有必要更進一步探討牛乳免疫球蛋白 G 分子的特性與安定性，相信從此研究的成果中，必能應用在其他與牛乳免疫球蛋白 G 性質相似的機能性蛋白質開發研究。

von Hippel 和 Wong⁽³⁾ 曾提出硫酸離子(sulfate ion)有保護蛋白質結構之功能。Arakwa 和 Timasheff⁽⁴⁾ 更進一

步以數種鹽類探討對於牛血清白蛋白(bovine serum albumin)和溶菌(lysozyme)分子結構與安定性之影響，發現由於 Na_2SO_4 具有硫酸離子所以有很好的安定分子結構之功能。而變性劑 guanidine hydrochloride (Gdn-HCl)常用研究蛋白質變性⁽⁵⁾。而有關於免疫球蛋白 G 在變性劑 guanidine hydrochloride 作用下，不同鹽類對其分子結構之影響的研究闕如，因此，本研究擬探討比較其免疫球蛋白 G 分子在不同蛋白質變性劑作用下、加熱與冷藏冷凍下、與不同飽和程度的脂肪酸及不同保護劑共存等條件下，鹽類之種類與濃度、溫度變化、脂肪氧化程度及保護劑種類等因素對免疫球蛋白 G 分子安定性之影響。期能尋求保護免疫球蛋白 G 之方法，使免疫牛乳在營養上或免疫功能上可發揮其最佳的功效。

四、結果與討論

陳⁽⁶⁾研究指出，牛乳 IgG 和雞蛋 IgY 在 Gdn-HCl 作用下之變性曲線圖中，牛乳 IgG 和雞蛋 IgY(最後濃度為 0.5 mg/ml)在 50 mM 磷酸鹽緩衝液 pH 7.0(含 0~5 M Gdn-HCl)，在激發波長 296 nm 下，掃描求得最大強度時之放射波長。Gdn-HCl 濃度增加使得失活更大，其放射波長之差值隨 Gdn-HCl 濃度增加而變大，以雞蛋 IgY 之差值大於牛乳 IgG 而言，顯示牛乳 IgG 分子安定性大於 IgY。其中 IgY 之來源即由雞血清 IgG，雞血清 IgG 含量約為 5 mg/ml，而蛋黃中 IgG (IgY) 含量約為 10 mg/ml⁽⁷⁾；且兩者之胺基酸的組成差異不大，由此可推知 IgG 由血清轉移至蛋黃中成 IgY 時，在蛋白質部份無顯著的修飾作用⁽⁸⁾。在鹽類對牛乳和雞血清 IgG 分子安定性之影響的研究結果顯示，牛乳或雞血清 IgG 分別含濃度 1.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 MgCl_2 、 CaCl_2 、 NaCl 、

CH₃COONa, 及含 Gdn-HCl 使最終濃度為 3.0 M, 使用螢光分光光譜儀測定在 295 nm 激發波長, 牛乳 IgG 在 350 nm 釋放波長下, 雞血清 IgG 在 350 nm 釋放波長下, 以加入 4.0 M Gdn-HCl 的溶液所測得的螢光強度最高做為 100%, 以蒸餾水做為 0%, 求出各溶液之相對螢光強度。其結果如圖一和圖二所示, 在圖一有關牛乳 IgG 部份, 發現含 1.0 M (NH₄)₂SO₄ 之相對螢光強度值在 86% 左右, 其餘含蒸餾水, 1 M MgCl₂、CaCl₂、NaCl、CH₃COONa 之相對螢光強度值均大於 100%, 以 MgCl₂、CaCl₂、CH₃COONa 較大, 顯示 (NH₄)₂SO₄ 的存在有助於安定牛乳 IgG 分子結構的效果。在圖二雞血清 IgG 部份, 發現含 1.0 M (NH₄)₂SO₄ 之相對螢光強度值在 92% 左右, 其餘含蒸餾水, 1 M MgCl₂、CaCl₂、NaCl、CH₃COONa 之相對螢光強度值均大於 100%, 其中以 MgCl₂ 之相對螢光強度值較大, 顯示 (NH₄)₂SO₄ 的存在同樣有助於安定雞血清 IgG 分子結構的效果。

牛乳或雞血清 IgG 分別不加或加入 (NH₄)₂SO₄ 使最終濃度分別為 0、0.25、0.5、1.0 M (NH₄)₂SO₄, 及加入 Gdn-HCl 使最終濃度分別為 0 ~ 4.0 M Gdn-HCl 之共存溶液, 使用螢光分光光譜儀測定在 295 nm 激發波長, 牛乳 IgG 在 350 nm 釋放波長下, 雞血清 IgG 在 350 nm 釋放波長下, 其結果如圖三和圖四所示, 在圖三牛乳 IgG 部份, 發現加入 0 ~ 4.0 M Gdn-HCl 後其相對螢光強度值隨 Gdn-HCl 濃度增加而上升, 說明 IgG 分子因為 Gdn-HCl 濃度增加而變性程度劇烈, 致使所測得之相對螢光強度值隨之上升。在相同 Gdn-HCl 濃度下, (NH₄)₂SO₄ 濃度高時有較低的相對螢光強度值, 說明 IgG 分子因為 (NH₄)₂SO₄ 濃度增高而增加其分子結構的安定性。在圖四雞血清 IgG 部份, 其結果與牛乳 IgG 部份相似, 證實在 Gdn-HCl 變

性劑下 (NH₄)₂SO₄ 的存在有助於安定牛乳和雞血清 IgG 分子結構的效果。Goto 等⁽⁹⁾ 以免疫球蛋白之輕鏈的變異區 (variable region) 及恒定區 (constant region) 片段為材料, 發現在 Gdn-HCl 變性劑下 (NH₄)₂SO₄ 對兩者皆有增加其分子結構安定性之功能, 與本實驗有同樣的情形; 與其結果比較, 由於免疫球蛋白 G 是完整的分子結構, 因此不若免疫球蛋白之輕鏈的變異區及恒定區片段破壞劇烈, 表現較其安定。von Hippel 和 Wong⁽³⁾ 曾提出硫酸根離子 (sulfate ion) 有保護球蛋白結構之功能, 此外 Arakwa 和 Timasheff⁽⁴⁾ 亦發現由於 Na₂SO₄ 具有硫酸根離子所以有安定牛血清白蛋白 (bovine serum albumin) 和溶菌 (lysozyme) 分子結構之功能, 據此推測 (NH₄)₂SO₄ 因為帶有硫酸根離子, 具有安定免疫球蛋白 G 分子之效果。

冷凍解凍和加熱處理對牛乳或雞血清 IgG 安定性之影響, 結果如圖五顯示在冷凍解凍部份, 未加甘油保護之 IgG, 其活性隨冷凍解凍次數增加而逐漸降低, 相對地有添加甘油時, 冷凍解凍次數的多寡對 IgG 活性影響不明顯。不同脂肪酸、包裝處理及脫氣處理對儲存中 IgG 安定性之影響, 結果如圖五顯示, 未經脫氣處理之透光包裝之 IgG 樣品, 由於不飽和脂肪酸氧化影響 IgG 活性, 因此殘存的 IgG 活性最低, 可確定不飽和脂肪酸氧化程度對 IgG 分子結構造成相當影響, 致使 IgG 的免疫活性降低。

六、成果自評

由於臺灣加入 WTO 後, 開放的自由經濟市場, 進口的乳品對於國內酪農業的打擊相當大, 因此酪農業與乳品業必須要升級, 以生物科技結合新進食品

科技改進乳品品質，開發新產品，以期提高附加價格，其中免疫牛乳的生產頗符合此項要求，並可提供具有機能性之乳品，對國人營養與健康是一大福音！

免疫牛乳係指利用生物科技，製備所需疫苗(抗原)接種注射在即將分娩的乳牛體內，經過適當的免疫處理所生產之具有免疫活性之牛乳。以此模式可開發出許多具有特殊性的免疫牛乳(含特異性不同的抗體)，因為只要改變疫苗(抗原)種類，即可開發不同特異性之免疫牛乳。許多研究報導指出其具有防止病原菌感染、抗發炎、預防心血管疾病及齲齒發生等功效。然而經過高溫加熱殺菌或高溫噴霧乾燥後，具有免疫活性之成分遭受到嚴重的破壞，失去原有之免疫功能，殊為可惜，倘借助免疫球蛋白分子安定性之研究，進一步瞭解其特性，必能有助於免疫活性之成分的保留與安定，使其發揮更大的功效！

本實驗研究工作由於設備及經費受限，整體而言完成 90%以上，成果亦相當可觀，對於 IgG 分子安定性更進一步瞭解，使其在加工處理上或包裝處理上，能保留更多且安定的 IgG；提供研究人員學習免疫處理之訓練，及免疫分析之經驗，所得之成果可供業界參考，並可將免疫機能性食品導入食品業，加速免疫機能性食品在臺灣之研發！

七、參考文獻

1. Hilpert, H., Brussow, H., Mietens, C., Sidoti, J., Lerner, L., and Werchau, H. 1987. Use of bovine milk concentrate containing antibody to rotavirus to treat rotavirus gastroenteritis in infants. *J. Infect. Dis.* 156:158.
2. Tacket, C. D., Losnsky, G., Link, H., Hoang, Y., Guerry, P., Hilpert, H., and Levine, M. M. 1988. Protection by

milk immunoglobulin concentrate against oral challenge with enterotoxigenic *E. coli*. *New Eng. J. Med.* 318:1240.

3. von Hippel, P. H. and Wong, K. Y. 1965. On the conformational stability of globular proteins. *J. Biological Chemistry* 240 (10):3909--3923.
4. Arakawa, T. and Timasheff, S. N. 1982. Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions. *Biochemistry* 21: 6545--6552.
5. Akerstrom, B., Brodin, T., Reis, K., and Bjorck, L. 1985. Protein G : a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Immunol.* 135:2589.
6. 陳昭誠 (1998) 牛乳免疫球蛋白 G 安定性之研究。國立臺灣大學食品科技研究所博士論文。臺北市。
7. 松田 幹、中村 良 (1993) IgG 抗體 卵母細胞 集積構造。農化 67: 1426-1429.
8. Salahuddin, A. and Tanford, C. (1970) Thermodynamics of the denaturation of ribonuclease by guanidine hydrochloride. *Biochemistry* 9(6): 1342-1347.
9. Goto, Y., Ichimura, N. and Hamaguchi, K. (1988) Effects of ammonium sulfate on the unfolding and refolding of the variable and constant fragments of an immunoglobulin light chain. *Biochemistry* 27: 1670-1677.

附加圖表