

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

應用雞蛋黃 IgY 精製與檢測牛乳中乳過氧化酶

Application of Hen Egg Yolk IgY to Separate and Assay Bovine Milk Lactoperoxidase

計畫編號: NSC 89-2313-B-041-016

執行期限: 自民國 89 年 8 月 1 日起至民國 90 年 7 月 31 日

主持人: 陳昭誠 執行機構及單位: 嘉南藥理科技大學食品衛生系

一、中文摘要

乳過氧化酶(LPO)是牛乳最主要的一種酵素，在乳過氧化酶系統(LP-s)中可催化抑制多種微生物生長，一般被認為是在人唾液中、乳中和淡水中的一種抗菌系統。最新研究亦指出此天然的抗菌系統可廣泛實際應用且具有很好的前瞻性。LPO 是一種在未經殺菌或熱處理的牛乳中常被發現的天然酵素，牛乳經 62.8°C、30 min 或 71~75°C、15~30 sec 熱處理，可殺死牛乳中非孢子型病原菌，但同樣地也使 LPO 失活。因此，LPO 活性檢測成為牛乳殺菌程度的指標，是牛乳品質安全分析中的重要項目。本實驗期望以免疫親和式膠體層析法得到純度高和回收率高又可量化生產之 LPO。結果顯示雞蛋黃 IgY 抗體之 ELISA 值在在免疫處理後第六週高達 2.175，直至第八週仍保持 0.875。以 LPO -Sephrose 4 Fast Flow immunoaffinity chromatography 分離 Anti-LPO IgY，得到其 binding capacity (q_m) and dissociation constant (K_d) 分別為 0.045 mg IgY/mL wet gel 和 4.58×10^{-8} M，顯示彼此間有很強的抗原與抗體作用力。另外，在以 anti-LPO IgY Sepharose 4 Fast Flow immunoaffinity chromatography 分離 LPO，得到其 binding capacity (q_m) and dissociation constant (K_d) 分別為 0.091 mg LPO/mL wet gel 和 4.82×10^{-7} M，顯示彼此間有很強的抗原與抗體作用力。

關鍵詞：乳過氧化酶、IgY、免疫親和式層析法、精製

英文摘要

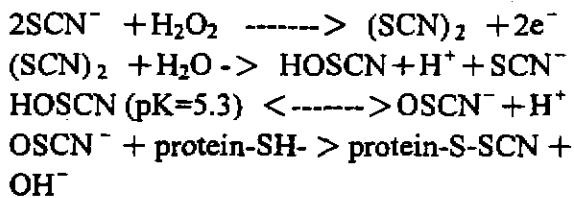
Lactoperoxidase (LPO) is quantitatively one of the most prominent enzymes in bovine milk; it catalyses the inactivation of many species of micro-organism in a lactoperoxidase system (LP-s). The recovery of LPO from milk and whey has renewed the interest in this enzyme as a natural antimicrobial tool for extending the shelf-life of milk and food products. Recent studies indicate that the field of actual and potential applications of these natural antimicrobial systems may be very broad. LPO is a native enzyme found in unpasteurized milk including bovine milk. Heat treatment of milk at 62.8°C for 30 min or 71~75°C for 15~30 sec, which kills nonsporeforming pathogenic microorganisms, will also inactivate LPO. Testing milk for LPO activity has become a common practice for regulatory and quality control purposes. In this study, we used the immunoaffinity chromatography method to separate LPO from milk and anti-bovine LPO IgY antibodies from hen egg yolk. Production of antibodies against bovine milk LPO could provide for the development of ELISA methods that would determine adequate pasteurization of milk. Results show that antibody (IgY) ELISA values of yolk was almost as high as 2.175 at the 6th week, after the initial immunization treatment. However, antibody ELISA values against LPO in yolk was 0.875 for 8 weeks. Different amounts of IgY purified by LPO -Sephrose 4 Fast Flow immunoaffinity chromatography were applied to the same column to determine the

binding capacity (q_m) and dissociation constant (K_d) of LPO-Sepharose 4 Fast Flow immunoaffinity gel for IgY specific against LPO. It was found that q_m was 0.045 mg IgY/mL wet gel and K_d was 4.58×10^{-8} M as determined by Langmuir-type adsorption isotherms. Different amounts of LPO purified by anti-LPO IgY Sepharose 4 Fast Flow immunoaffinity chromatography were applied to the same column to determine the binding capacity (q_m) and dissociation constant (K_d) of anti-LPO IgY Sepharose 4 Fast Flow immunoaffinity gel for LPO. It was apparent that the binding capacity (q_m) of anti-LPO IgY immunoaffinity gel for commercial LPO was 0.091 mg/mL wet gel. However, the dissociation constant (K_d) (4.82×10^{-7} M) of immunoaffinity gel for commercial LPO.

二、緣由與目的

乳過氧化酶(lactoperoxidase, LPO)是存在牛乳中的天然酵素，可氧化分子生成產物以抑制細菌生長。在過氧化氫存在下能氧化有機物，藉 LPO 的作用能以過氧化氫與硫代氰酸鹽(thiocyanate)而生成次硫代氰酸鹽(hypothiocyanate)化合物，這種生成物(OSCN⁻)能破壞菌膜可供抗菌功用，利用於牛乳或發酵製品的殺菌或靜菌，或以延長製品之保存期限。其中乳過氧化酶為特殊可供抗菌作用的酵素，其抗菌機制如下：

LPO



其中 LPO 的作用能在過氧化氫與硫代氰酸鹽(thiocyanate, 含 SCN⁻)存在下，生成次硫代氰酸鹽(hypothiocyanate, 含 OSCN⁻)的化合物，此化合物可使菌膜或菌體內蛋白質中帶-SH 基之胺基酸形成-S-S-雙硫基鍵結，因此影響菌體蛋白質與酵素功能，使其無法正常生長，達到抑菌

甚至殺菌之功能。研究指出 G(-)、catalase(+) 菌，如 pseudomonads、coliforms、salmonellae 和 shigellae，不僅乳過氧化酶系統可抑制其生長，同時過氧化氫也有殺菌效果；至於 G(+)、catalase(-) 菌，如 streptococci 和 lactobacilli，在乳過氧化酶系統存在下且過氧化氫充足下，會有 self-inhibitory 作用，同樣有抑制其生長之功能。有學者研究指出 LPO 與 SCN⁻ 及 H₂O₂ 共存則有靜菌作用(bacteriostatic)，而 LPO 與 I⁻ 及 H₂O₂ 共存則有殺菌作用(bactericidal)，顯示 SCN⁻/I⁻ 比值與過氧化酶系統抗菌的功効有關。

傳統分離純化 LPO 的方法多未盡理想如表一所示，如沉澱法純度和回收率並不高；而層析法(以陽離子交換層析法，常用膠體為 R-O-CH₂COO⁻、R-CH₂-SO₃⁻)不易擴大規模及連續化生產。本實驗將嘗試以操作簡便且易於量化生產之免疫親和式膠體層析法來純化 LPO。免疫親和式膠體管柱層析法是利用抗原及抗體高度專一性結合作用的原理，將特異性抗體或抗原以共價鍵結結合到固體支持物如 Sepharose 上而後裝填到管柱內，待含有抗原或特異性抗體的混合物緩慢通過管柱時，只有具特異性之抗原和抗體才可高度專一性結合，而其他成分因無法結合則會通過管柱後被沖出。至於結合上的抗原或抗體可以依流洗液中鹽濃度或 pH 值的變化，將其流洗出而達分離精製目的。

三、結果與討論

本研究以 LPO 免疫處理兔子及來亨雞，探討其蛋黃液中抗體之生成變化。來亨雞經一次注射及隔週補強注射，共補強注射三次，每次注射前採取少量血，並將免疫前後之產蛋收集，以 ELISA 法測量蛋黃中抗 LPO 抗體之活性及 titer 變化(圖 1, 2)，隨著稀釋倍數的增加，抗 LPO 抗體之活性明顯減低，可見經免疫後抗 LPO 抗體之產量相當多。另外，由圖 1 結果中得知，隨著免疫日數的增加，實驗所得之蛋黃液中抗 LPO 抗體之 ELISA 值，

在第二次免疫前來亨雞蛋黃液 ELISA 值為 0.213，此後 ELISA 值持續上升至第 6 週的 2.175 才開始下降。而 titer 值如圖 2 所示，在第四次免疫後的第 5、6 週都可達到最高的 titer 值 10^6 。與前人研究抗酪蛋白抗體、抗丙型球蛋白抗體、抗乳鐵蛋白抗體結果比較，可看出抗 LPO 抗體之 titer 值變化相似。此結果可印證一事實即良好的抗原至少約需具有 3-5kD 的分子量 (LPO 的分子量 78kD) 才能誘發良好的抗體反應。

將免疫親和式層析法應用於純化高純度的抗體，結果如圖 3 所示。發現在收集管第 31 管有一高峰，將第 29-34 管收集中和其 pH 後，以 ELISA 法定量抗 LPO 抗體。圖 4 為抗 LPO 抗體 IgY 與免疫親和式膠體的等溫吸附曲線，此曲線符合 Langmuir isotherm。若以 Lineweaver Burk 繪圖 (圖 5)，可直接求出 $Q_{max}=0.045$ mg/ml wet gel 與 $K_d = 4.58 \times 10^{-6} M$ 。Ling and Mattison 指出 K_d 值需小於 $10^{-6} M$ ，才使得 90% 以上被吸附之蛋白質不至於被 starting buffer 沖洗出。圖 6 為 LPO 與免疫親和式膠體的等溫吸附曲線，此曲線符合 Langmuir isotherm。若以 Lineweaver Burk 繪圖 (圖 7)，可直接求出 $Q_{max}=0.091$ mg LPO/ml wet gel 與 $K_d = 4.82 \times 10^{-7} M$ 。Ling and Mattison 指出 K_d 值越小表示親和性吸附作用力越強。本研究 K_d 值小於 $10^{-6} M$ ，可知親和性吸附作用力很強。

四、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，其中牛乳中具有生理活性成分的分離與應用頗符合此項要求，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！

本研究以操作簡易且耐用性佳之免疫親和式層析法來獲得高純度之 LPO。期望

以雞蛋黃中唯一抗體 IgY 製備的諸多優點，克服傳統免疫處理動物之抽血不易及血清產量有限等問題，甚至能取代傳統血清法，以利建立 IgY 親和式固定化分離模式，使其更具時實用性。並可廣泛用於多種有經濟價值蛋白質或酵素的回收以供藥用，甚至考慮此抗體之他種固定化模式，以配合業界大量生產之目的。

實驗研究工作由於設備及經費受限，整體而言完成 95% 以上，成果亦相當可觀，現有二篇正著手投稿國外著名 SCI 食品相關期刊。本研究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！

五、參考文獻

1. Thomas, E. L. 1983. Products of lactoperoxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate and halides. In: The lactoperoxidase system. Chemistry and Biological Significance. Marcel Dekker Inc., New York. p.31-53.
2. Pruitt, K. M., Tenovuo, J., Andrews, R. W. and McKane, T. 1982. Lactoperoxidase - catalyzed oxidation products. *Biochemistry*. 21:562-567.
3. Adamson, M. and Pruitt, K. M. 1981. Lactoperoxidase-catalyzed inactivation of hexokinase. *Biochem. Biophys. Acta* 658:238-247.
4. Bjorck, L., Rosen, C. G., Marshall, V. M. and Reiter, B. 1975. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against pseudomonads and other gram-negative bacteria. *Appl. Microbiol.* 30:199-204.
5. Purdy, M. A. and White, W.E. 1983. Effect of growth phase and cell envelope structure on susceptibility of *Salmonella typhimurium* to the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system. *Infection and Immunity*. 39:1187-1195.
6. Oram, J. D. and Reiter, B. 1966. The inhibition of streptococci by lactoperoxidase, thiocyanate and

hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 100:373-381.

7. Klebanoff, S. J. and Luebke, R. G. 1966. The peroxidase - thiocyanate - hydrogen peroxide antimicrobial system. *Biochem. Biophys. Acta* 117:63-72.

8. Carmen, M., Markwijk, B. W. and Vreeman, H. J. 1990. Isolation and properties of lactoperoxidase from bovine milk. *Neth. Milk Dairy J.* 44:213-231.

9. Paul, K. G. and Ohlsson, P.I. 1985. The Chemical structure of lactoperoxidase. p.15-29. Marcel Dekker Inc., New York.

10. Stanislawski, M. and Ito, H. O. 1989. Immunotoxins containing glucose oxidase and lactoperoxidase with tumoricidal properties: in vitro killing effectiveness in a mouse plasmacytoma cell model. *Cancer Res.* 49:5497-5504.

11. Lefkowitz, D. L. and Castro, A. 1990. Induction of tumor necrosis factor and cytotoxicity by macrophages exposed to lactoperoxidase and microperoxidase. *Life Sci.* 47:703-710.

附加圖表

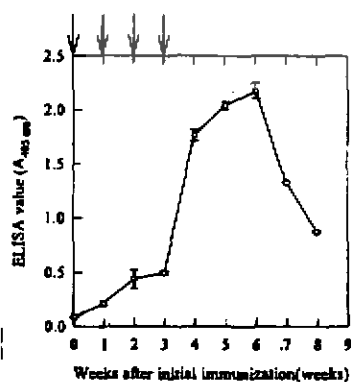


Figure 1. Changes in anti-LPO IgY antibody ELISA values of hen yolk during the immunization period. Hens were immunized with LPO once one week for 3 weeks after initial immunization. Arrows indicate the immunization schedule.

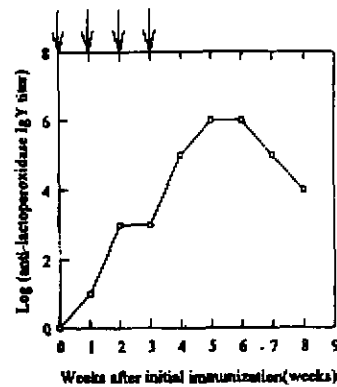


Figure 2. Changes in anti-LPO IgY titer of hen yolk during the immunization period. Hens were immunized with LPO once one week for 3 weeks after initial immunization. Arrows indicate the immunization schedule.

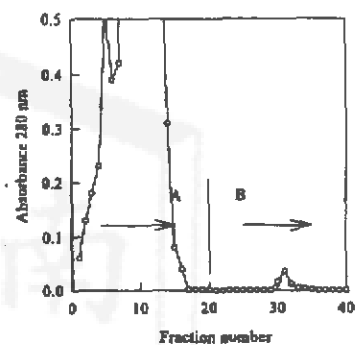


Figure 3. Elution profile of anti-LPO IgY by LPO-Sepharose 4 Fast Flow immunoadfinity chromatography. Column size, 20 cm in length \times 1.6 cm in diameter; Sample, 5 μ l crude IgY; Elution buffer, 0.5 M NaCl/0.1 M phosphate-citrate buffer (pH 2.8); Flow rate, 0.2 ml/min; Fractionation, 2.0 ml/tube

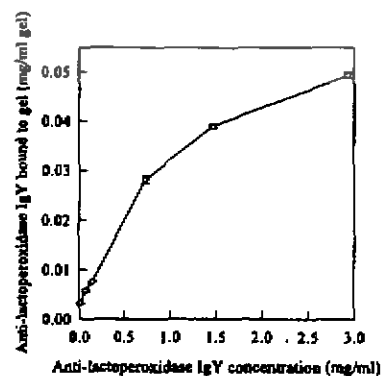


Figure 4. Apparent adsorption isotherm of LPO-Sepharose 4 Fast Flow immunoadfinity gel for anti-LPO IgY. Experimental conditions were the same as in Fig. 3.

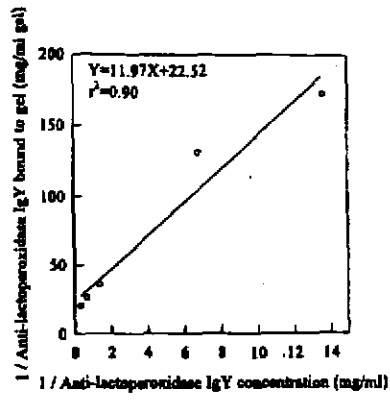


Figure 5. Lineweaver-Burk line of LPO-Sepharose 4 Fast Flow immunoaffinity gel for anti-LPO IgY. Experimental conditions were the same as in Fig. 3.

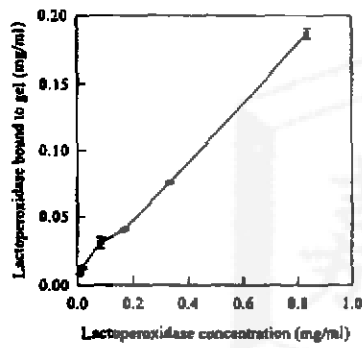


Figure 6. Apparent adsorption isotherm of anti-LPO IgY Sepharose 4 Fast Flow immunoaffinity gel for LPO. Experimental conditions were the same as in Fig. 3.

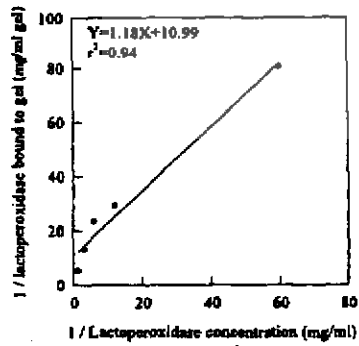


Figure 7. Lineweaver-Burk line of anti-LPO IgY Sepharose 4 Fast Flow immunoaffinity gel for LPO. Experimental conditions were the same as in Fig. 3.