

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

鴨蛋蛋黃中 IgY 之純化與性質

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-041-004-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：嘉南藥理科技大學食品衛生系

計畫主持人：陳昭誠

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 92 年 10 月 7 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 鴨蛋蛋黃中 IgY 之純化與性質

### Purification and Characterization of IgY from Duck Egg Yolk

計畫編號: NSC 91-2313-B-041-004

執行期限: 自民國 91 年 8 月 1 日起至民國 92 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

特異性抗體如蛋黃中的免疫球蛋白，逐漸廣泛應用在病毒感染的治療、特殊分子結構的偵測與鑑識、食品的分析檢測和複合物的結構與功能之判定。IgY 在醫療方面的應用，已被使用在傳染性痢疾的治療，和應用被動免疫療法於預防齲齒的防治有很好功效。許多相關研究報導皆以雞蛋蛋黃中的免疫球蛋白(IgY)為研究對象，然而在臺灣產值僅次於雞蛋，且在華人世界常見的鴨蛋其相關研究闕如，吸引吾人投入研究以瞭解鴨蛋 IgY 的分離純化方法與性質。

結果顯示鴨蛋粗 IgY 液經 Sephacryl S-400 HR 膠過濾層析之結果，在收集管第 68 支有明顯波峰，經 ELISA 法測定確定為鴨蛋 IgY。鴨蛋 IgY 性質與熱安定性之研究結果顯示，鴨蛋 IgY 在較酸(pH 4 以下)及較鹼(pH 10 以上)條件下其活性急速喪失。熱安定性研究結果顯示，愈高溫下鴨蛋 IgY 失活愈顯著，鴨蛋 IgY 之 ELISA 值隨加熱溫度增高和加熱時間增長而逐漸下降，尤其在高溫(80~100)時失活更顯著，酵素對精製鴨蛋 IgY 之作用結果，顯示鴨蛋 IgY 活性隨作用時間增長而降低，胃蛋白鈣在 pH 2、酵素/受質比為 1/40 時鴨蛋 IgY 之 ELISA 值最低。在 SDS-PAGE 電泳圖中精製 IgY 的部份，在分子量 66.4 和 55.6 kDa 為重鏈及分子量在 36.5 kDa 附近為輕鏈。

**關鍵詞：**鴨蛋、免疫球蛋白、IgY、純化、性質

#### 英文摘要

Specific antibodies, including immunoglobulins from egg yolk, have increasing applications in virus diagnosis, in detection and estimation of specific molecules, in food analysis and as an alternative approach in determination of structure and function of complex molecules. Therapeutic applications of IgY were demonstrated in animals by using it for treatment of infectious diarrheal diseases and protection against dental caries by passive immunization.

Crude duck IgY was partially purified by 0.225% pectin and applied to Sephacryl S-400 HR gel chromatography. The elution profile and ELISA value (405 nm) of crude IgY were determined as shown in Fig. 1 and 2. Separated duck IgY was

found to be unstable and susceptible to denaturation when incubated at pH<4 or pH>10. In thermal stability tests, duck IgY activity decreased with the increasing temperature, from 80 to 100 . In a test of stability against gastrointestinal proteases, the residual IgY activity was observed to decrease with increasing reaction time with proteases. However, Duck IgY treated with pepsin ( pH 2.0, E/S=1/40 ) lost activity, probably due to pH denaturation. The separated duck IgY shows a remarked heavy chain band between MW 66.4 and 55.6 kDa or a light chain band around MW 36.5 kDa in SDS-PAGE gel.

Keywords : Duck egg、Immunoglobulin、IgY、Purification、Characterization

## 二、緣由與目的

機能性免疫食品受到大眾歡迎，除了醫療外，尚包括免疫機能較差的嬰兒與老年人的需求(臺灣即將邁入高齡化社會)，和預防保健意識的提昇，相信未來必能成為保健食品的主流！其中蛋黃 IgY (Immunoglobulin yolk)含量高分離容易，且產量大為 IgY 獲得上之優點。蛋黃中的蛋白質大部分為磷蛋白質與脂質結合的脂蛋白及磷蛋白質，包括低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、脂卵黃磷蛋白(lipovitelin)、卵黃磷蛋白(phosvitin)、卵黃球蛋白(livetin)及核黃素結合蛋白(yolk riboflavin binding protein, YRBP)。卵黃球蛋白可再細分為  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -卵黃球蛋白，其中  $\gamma$ -卵黃球蛋白因具有免疫活性故被稱為 Immunoglobulin yolk，簡稱為 IgY (Hatta et al ; 1990)。近來有文獻指出(Otake et al.,1991 ; Hatta et al.,1993 ; Shimizu et al.,1988)將雞隻施以免疫處理後，可自其產下的雞蛋黃中分離出具有專一性的抗體，除應用在預防齲齒之外，Hatta 等(1993)指出在未開發國加中常發生嬰幼兒感染輪狀病毒(rotavirus)所引起的下痢、嘔吐、發熱，甚至造成死亡，而雞蛋中含有 10 mg/ml 的抗體且其取得方便，故雞隻經特異性免疫處理後所得的 IgY 可以做為抗輪狀病毒的來源，此外，IgY 也可以結合大腸桿菌細胞，使其無法分裂生長，造成生態位階改變而降低腸胃道疾病的發生率(Shimizu et al.,1988)。

自蛋黃中將水溶性 IgY 分離純化的方法，主要是利用沉澱、離心或層析等方法，最近已開發出有機溶媒脫脂法、酸液稀釋分離法、聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG ) 添加法、Dextran sulfate 沉澱法、超臨界二氧化碳與乙醇共同抽出法、乙醇區分法、陰電性多醣體添加法等，然而多數因其使用不符合食品衛生安全規定而不能利用於食品上。此外，尚需考量操作簡易、可大量生產及成本低等條件，因此仍有待進一步研究合適之方法。相關純化分離 IgY 之方法如下所述：

1. 氯仿-聚乙二醇(Estevés and Binaghi , 1972 ; Polson , 1990)。
2. 膠過濾法(Burlet and Vadehra , 1979)。
3. 超高速離心去脂蛋白(Bee and Cotterill , 1979)。
4. Dextran sulfate 添加法(Jensenius , 1981 ; Akita and Nakai , 1993)。

5. 酸液稀釋分離法及層析法並用 (Akita and Nakai, 1992; Fichtali et al., 1993)。
6. 有機溶媒脫脂法(Bade and Stegemann, 1984)。
7. 超臨界二氧化碳與乙醇共用萃取法(大塚等, 1993)。
8. 以乙醇區分法(Horikoshi et al., 1993)。
9. 疏水性作用層析及膠過濾層析並用法(Hassl and Aspöck, 1988)。
10. 陰電性多醣體添加法(Hatta et al., 1990); (McCannel and Nakai, 1989); (Chang et al., 2000)。
11. 親和式層析法(Staak et al., 1996); (Tu et al., 2001)。
12. 超過濾膜 (UF)分離法 (Kim and Nakai, 1998)。

### 三、結果與討論

鴨蛋蛋黃以 0.225% 果膠製得之粗 IgY 液經 Sephacryl S-400 HR 膠過濾層析之結果如圖一所示，在收集管第 68 及 79 支有明顯波峰，經 ELISA 法測定各收集管之 IgY 活性，如圖二所示，得知在第 68 支之 ELISA 值最高，確定為鴨蛋 IgY。另以市售 HiTrap IgY purification HP 膠體進行親和式層析(圖三)，進一步純化鴨蛋 IgY，發現改以沖提緩衝液沖提，在第 14 支有一明顯波峰，經 ELISA 法測定為鴨蛋 IgY。將純化之鴨蛋 IgY 以 Sephacryl S-300 HR 膠過濾層析之結果如圖四所示，得到鴨蛋 IgY 分子量約為 175 kDa，屬於高分子量之蛋白質，與雞蛋 IgY 分子量相近。在圖五 SDS-PAGE 電泳圖中，精製 IgY 的部份在分子量 66.4 和 55.6 kDa 為重鏈及分子量在 36.5 kDa 附近為輕鏈。

鴨蛋 IgY 性質與熱安定性之研究結果顯示，鴨蛋 IgY 在較酸(pH 4 以下)及較鹼(pH 10 以上)條件下其活性急速喪失(圖六)。圖七中有關鴨蛋 IgY 熱安定性研究結果顯示，愈高溫下鴨蛋 IgY 失活愈顯著，鴨蛋 IgY 之 ELISA 值隨加熱溫度增高和加熱時間增長而逐漸下降，尤其在高溫(80~100)時失活更顯著。酵素對精製鴨蛋 IgY 之作用結果(圖八)，顯示鴨蛋 IgY 活性隨作用時間增長而降低，胃蛋白鈣在 pH 2、酵素/受質比為 1/40 時鴨蛋 IgY 之 ELISA 值最低。從以上得知，要應用鴨蛋 IgY 在食品或醫藥上，仍須要進一步以保護劑或微膠囊化，以增進其安定性。

### 四、成果自評

由於臺灣加入 WTO 後，開放的自由經濟市場，對於國內產業的打擊相當大，因此產業必須要升級，若與生物科技結合新進食品科技改進蛋品利用價值，開發新產品，以期提高附加價格，其中鴨蛋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蛋品，對國人營養與健康是一大福音！

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，現有一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

- Akita, E.M. and Naki, S. 1992. Immunoglobulins from egg yolk isolation and purification. *J. Food Sci.* 57 : 629-633.
- Akita, E.M. and Naki, S. 1993. Comparison of four purification methods for the production of Immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J. Immunol. Methods* 160 : 207-214.
- Bee, L. E. M. and Cotterill, O. J. 1979. Ion-exchange chromatography and electrophoresis of egg yolk proteins. *J. Food Sci.* 44:656-667.
- Chang, H. M., Lu, T. C., Chen, C. C., and Tu, Y. Y. 2000. Isolation of immunoglobulin from egg yolk by anionic polysaccharides. *J. Agric. Food Chem.* 48:995-999.
- Chang, H. M., Ou-Yang, R. F., Chen, Y. T. and Chen, C. C. 1999. Productivity and some properties of immunoglobulin specific against *Streptococcus mutans* serotype c in chicken egg yolk (IgY). *J. Agri. Food Chem.* 47(1): 61-66.
- Chang, H. M., Lu, T. C., Chen, C. C., and Tu, Y. Y. 2000. Isolation of immunoglobulin from egg yolk by anionic polysaccharides. *J. Agric. Food Chem.* 48:995-999. Chen, C. C. and Chang, H. M. 1998. Effect of thermal protectants on the stability of bovine milk immunoglobulin G. *J. Agri. Food Chem.* 46(9): 3570-3576.
- Estves, M. B. and Binaghi, R. A. Antigenic similarities among mammalian immunoglobulins. *Immunology.* 23:137-145.
- Fichtali, J., Charter, E. A., Lo, K.V. and Nakai, S. 1993. Purification of antibodies from industrially separated egg yolk. *J. Food. Sci.* 32 : 52-56.
- Fukumoto, L. R., Skura, B. J. and Nakai, S. 1994. Stability of membrane-sterilized bovine immunoglobulins aseptically added to UHT milk. *J. Food Sci.* 59 : 757- 759,762.
- Hatta, H., Kim, M., and Yamamoto, T. 1990. A novel isolation method for hen egg yolk antibody. *Agric. Biol. Chem.* 54 : 2531-2535.
- Horikoshi, T., Hiraoka, J., Saito, M. and Hamada, S. 1993. IgG antibody from hen yolks : purification by ethanol fraction. *J. Food Sci.* 58 : 739-742,779.
- Kim, H. and Nakai S. 1998. Immunoglobulin separation from egg yolk : a serial filtration system. *J. Food Sci.* 61 : 510-512, 523.
- McNulty, M. S., Allan, G. M. and Stuart, J. C. 1978. Rotavirus infection in avian species. *Vet. Rec.* 103 : 319-320.
- Polson, A. 1991. Zone electrophoresis of anti-human sperm anti-bodies in concentration gradients of sucrose. *Immunol. Invest.* 21 : 451-459.
- Polson, A. 1993. Chicken IgY-Fc antibody elicited in a rabbit as first coat on frosted glass beads in immunoassays. *Immunol. Invest.* 22 : 353-363.

- Rose, M. E., Orlans, E. and Buttress, N. 1974. Immunoglobulin. *J. Immunol.* 4 : 521-523.
- Shimizu, M., Fitzsimmons, R. C., and Nakai, S. 1988. Anti- *E.coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J. Food Sci.* 53 : 1360-1366.
- Snodgrass, D. R. and Wells, P. W. 1978. The influence of colostrum on neonatal rotaviral fections. *Ann. Rech. Vet.* 9 : 335-338.

## 附加圖表

