

微膠囊化牛初乳及乳清 IgG 之安定性研究

沈子偉、張基郁

E-mail: 9510791@mail.dyu.edu.tw

摘要

本研究以取自母牛分娩後第二至四天分泌且等體積混合的乳汁作為材料，以阿拉伯膠、 β -環狀糊精和幾丁聚醣之10%水溶液，依1:4體積比和牛初乳或乳清混合，以冷凍及噴霧乾燥法進行微膠囊化，並探討pH值、溫度、胃腸道蛋白 γ 、微生物脂多醣及儲藏時間對微膠囊化初乳與乳清IgG活性之影響。結果顯示冷凍乾燥法所得之微膠囊化初乳其IgG活性比噴霧乾燥法所得者高。在酸鹼安定性方面，未微膠囊化之初乳在pH 7~8有較高之IgG活性，經微膠囊化者則以阿拉伯膠所得者在pH 7~8時有較高之IgG活性。在熱安定性方面，阿拉伯膠和 β -環狀糊精對於初乳或乳清之IgG均具有保護作用。在胃腸道蛋白 γ 耐受性方面，以阿拉伯膠及 β -環狀糊精微膠囊化之初乳經胃蛋白 γ 作用2小時後，其IgG殘存活性較未微膠囊化者分別高出9.8及7.6%，再經胰蛋白 γ 作用4小時後，有、無微膠囊化處理則無顯著之差異性；而微膠囊化對乳清之胃蛋白 γ 及胰蛋白 γ 耐受性則無顯著影響。在與微生物脂多醣作用方面，E. coli O55:B5與初乳或乳清之IgG有抗原-抗體親和性反應，而以阿拉伯膠微膠囊化者，在經過胃蛋白 γ 作用後，其與E. coli O55:B5脂多醣作用後之IgG活性較未微膠囊化者高。在儲藏安定性方面，儲藏溫度與包裝材質對於初乳或乳清之IgG殘存活性有顯著影響，在4°C儲存60天後之IgG活性較室溫高，以鋁袋包裝儲存者高於以透明塑膠袋包裝者，以阿拉伯膠微膠囊化之初乳在4°C儲存60天後之IgG殘存活性顯著高於未微膠囊化者。

關鍵詞：牛初乳， β -環狀糊精，幾丁聚醣，阿拉伯膠，微膠囊化

目錄

封面內頁 簽名頁 授權書iii 中文摘要iv 英文摘要vi 誌謝viii 目錄ix 圖目錄xii 表目錄xv 第一章前言1 第二章文獻回顧3 2.1牛初乳3 2.1.1牛初乳簡介3 2.1.2牛初乳的成分4 2.1.3牛初乳中蛋白質組成4 2.2免疫系統7 2.2.1免疫系統及其反應7 2.2.2抗體簡介9 2.2.3抗體的種類10 2.2.4抗體之防禦機制11 2.2.5免疫球蛋白之安定性15 2.3免疫球蛋白G (IgG)之分析法16 2.3.1定量分析16 2.3.2定性分析19 2.4微膠囊化19 2.4.1微膠囊化定義19 2.4.2微膠囊化方法20 2.4.3微膠囊化包覆粉體種類24 第三章材料與方法32 3.1實驗材料32 3.1.1樣品製備32 3.1.2包覆粉體32 3.1.3試藥33 3.1.4儀器33 3.2實驗方法34 3.2.1基本組成分析34 3.2.2牛初乳與乳清之微膠囊化38 3.2.3電子顯微鏡之觀察41 3.2.4微膠囊化IgG安定性之測定41 3.2.5IgG對胃腸蛋白 γ 之耐受性42 3.2.6牛初乳和乳清與微生物脂多醣之親和性43 3.2.7統計分析44 第四章結果與討論45 4.1初乳和乳清之一般基本組成45 4.2初乳IgG之定量分析47 4.3微膠囊化處理47 4.3.1不同微膠囊化方法之比較47 4.3.2電子顯微鏡觀察結果50 4.4酸鹼對IgG安定性影響53 4.5熱處理對IgG安定性影響58 4.6胃腸消化酵素對IgG之影響62 4.7與微生物脂多醣作用之親和力64 4.8初乳與乳清IgG之儲藏安定性68 第五章結論76 參考文獻78 圖目錄 圖2.1免疫球蛋白的結構：(a)分子結構(b)分子褶疊的特徵結構13 圖2.2微膠囊的各種包覆形式22 圖2.3 β -環狀糊精結構27 圖2.4幾丁質及幾丁聚醣之化學結構30 圖3.1本研究之實驗流程35 圖3.2酵素連接免疫吸附分析法39 圖4.1牛血清IgG以ELISA法所得之標準曲線48 圖4.2牛血清IgG以ELISA法所得之標準曲線及線性回歸之R-square(0.9882)48 圖4.3以不同乾燥法進行微膠囊化所得初乳之IgG殘存活性49 圖4.4以不同乾燥法進行微膠囊化所得初乳之IgG殘存活性51 圖4.5初乳(A)及以阿拉伯膠(B)、 β -環狀糊精(C)、幾丁聚醣(D)微膠囊化之初乳掃描式電子顯微照片52 圖4.6乳清(A)及以阿拉伯膠(B)、 β -環狀糊精(C)、幾丁聚醣(D)微膠囊化之乳清掃描式電子顯微照片54 圖4.7在不同pH值下之初乳和微膠囊化初乳之IgG活性55 圖4.8在不同pH值下之乳清和微膠囊化乳清之IgG活性56 圖4.9在pH 7和8下之初乳及微膠囊化初乳之IgG殘存活性57 圖4.10在pH 7和8下之乳清及微膠囊化乳清之IgG殘存活性59 圖4.11初乳及微膠囊化初乳分別經63.5°C 加熱30 min及75°C 加熱15 sec後之IgG殘存活性60 圖4.12乳清及微膠囊化乳清分別經63.5°C 加熱30 min及75°C 加熱15 sec後之IgG殘存活性61 圖4.13初乳和乳清於不同pH值下經pepsin作用1、2、4、8小時後之IgG殘存活性63 圖4.14初乳及微膠囊化初乳以胃蛋白 γ 作用2小時及胰蛋白 γ 作用4小時後之IgG殘存活性65 圖4.15乳清及微膠囊化乳清以胃蛋白 γ 作用2小時及胰蛋白 γ 作用4小時後之IgG殘存活性66 圖4.16初乳與乳清經E. coli O55:B5脂多醣及兔子抗牛血清IgG反應後之ELISA值67 圖4.17未微膠囊化及以阿拉伯膠微膠囊化之初乳與乳清經胃蛋白 γ 和胰蛋白 γ 水解後，再經E. coli O55:B5脂多醣作用後之IgG殘存活性69 圖4.18未微膠囊化及以阿拉伯膠微膠囊化之初乳和乳清以透光塑膠袋包裝並在不同溫度(4°C和室溫)下儲存60天期間之IgG殘存活性70 圖4.19未微膠囊化及以阿拉伯膠微膠囊化之初乳和乳清以鋁袋包裝並在不同溫度(4°C和室溫)下儲存60天期間之IgG殘存活性72 圖4.20未微膠囊化與微膠囊化初乳和乳清在室溫下以透光塑膠袋和鋁袋儲存60天後之IgG殘存活性73 圖4.21未微膠囊化與微膠囊化初乳和乳清在4°C和室溫下以透光塑膠袋儲存60天後之IgG殘存活性74 表目錄 表2.1初乳與常乳的成分5 表2.2微膠囊包覆各種技術23 表4.1初乳和乳清一般基本組成46

參考文獻

- 中文部份
- 1.大竹繁雄、平澤正知、津田 憲。1993。雞蛋抗體對於口腔疾病及消化道感染的預防利用。農化67:1437-1439。
 - 2.方鴻明、吳志修。1988。免疫學-第四章:免疫學者使用的方法。大學圖書出版社。台北市。
 - 3.王政光等 編著。2004。免疫學。新文京開發出版股份有限公司。台北縣。
 - 4.王瑞廷 編著。1995。免疫醫用微生物學與免疫學。合記圖書出版社。台北市。
 - 5.王瑞廷。1995。醫用微生物學與免疫學-第五十七章:免疫。合記圖書出版社。台北市。
 - 6.行政院農業委員會。2003。九十二年農業統計年報。第148頁。
 - 7.吳則雄。1980。認識牛的初乳。乳業98/99:9-14。
 - 8.李陽春。1999。以幽門螺旋桿菌(*Helicobacter pylori*)之尿素?免疫處理雞所產雞蛋蛋黃微膠囊化後抗體的安定性研究。台灣大學食品科技研究所碩士論文。台北市。
 - 9.沈明來 編著。2000。生物檢定統計法。九州圖書文物有限公司。台北市。
 - 10.林志城、陳凱萍、林仲聖。2003。生物膠囊化紫紅麴菌的抗氧化活性評估。健康管理學刊1 (1):63-70。
 - 11.林宜慧。1997。以 γ -環狀糊精移除雞蛋蛋黃中膽固醇的探討。靜宜大學食品營養學系碩士論文。台中縣。
 - 12.林虔宏。2001。蛋黃卵磷脂微膠囊之製作及其物理性質之探討。中興大學畜產學系碩士論文。台中縣。
 - 13.邱少華。2000。幾丁聚醣在藥物控制釋放上的應用以及其微膠囊製備的技術。生物資源 生物技術vol.2 (3):19-23。
 - 14.張長泉。1986。酵素免疫分析方法。食品工業18(3):11-15。
 - 15.張湘文。2000。環狀糊精在食品工業上之應用。食品工業32 (7):30-40頁。
 - 16.陳昭誠、杜豔櫻、張鴻民。1999。牛乳IgG之酵素水解物性質。食品科學26:496-506。
 - 17.陳昭誠。1998。牛乳免疫球蛋白G安定性之研究。台灣大學食品科技研究所博士論文。台北市。
 - 18.曾慶瀛、余哲仁、李錦楓。1994。蜂王乳粉末化之製備與其貯存期間物性變化之研究。中國農業化學會誌32 (1):113-124。
 - 19.楊正護。1983。剩餘初乳利用性之研究。中興大學畜牧研究所碩士論文。台中市。
 - 20.劉瓊淑。1994。幾丁質，幾丁聚醣及其相關酵素之特性與應用。食品工業26:26-36。
 - 21.蔡育霖。2002。PLGA/Phospholipid 微小球對包覆之蛋白質控制釋放之影響。中原大學醫學工程學系碩士論文。桃園縣。
 - 22.盧冠霖等編著。2002。新編免疫學。永大書局。台北市。
 - 23.賴滋漢、金安兒。1991。食品加工學製成品篇第181-196頁。富林出版社。台中市。
 - 24.蘇家愷。1995。自牛初乳中分離免疫球蛋白與乳鐵蛋白博士論 文。台灣大學食品科技研究所。台北市。
- 英文部份
- 1.AOAC. 1998. Official methods of analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemist. Washington, DC.
 - 2.Apinan, S., Kohei, T., Kenji, O., Daisuke, M., Hidefumi, Y., Takeshi, F., Masaaki, O. and Pekka, L. 2004. Microencapsulation of l-menthol by spray drying and its release characteristics. Innovative Food Science and Emerging Technologies 6:163-170.
 - 3.Arguello, A., Castro, N., Capote, J., Tyler, J. W. and Holloway, N. M. 2004. Effect of colostrum administration practices on serum IgG in goat kids. Livestock Production Sci.90:235-239.
 - 4.Bone, R. C. 1991. The pathogenesis of sepsis. Ann. Intern.Med.115: 457-469.
 - 5.Brunner, J. R. 1981. Cow milk proteins: Twenty-five years of progress. J. Dairy Sci.64:1038-1054.
 - 6.Brussow, H., Hilpert, H., Walther, I., Sidoti, J., Mietens, C.,and Bachmann, P. 1987. Bovine milk immunoglobulins for passive immunity to infantile rotavirus gastroenteritis. J. Clin.Immunol. 25: 982-986.
 - 7.Caffin, J. P., Poutrel, B. and Rainard, P. 1983. Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G1 (IgG1) concentration in milk. J. Dairy Sci. 66: 2161-2166.
 - 8.Chiang, S. H. and Chang, C. Y. 2005. Antioxidant properties of caseins and whey proteins from colostrums. J. Food Drug Anal. 13(1): 57-63.
 - 9.Conway, P. L., Corbach, S. L. and Godin, B. R. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. J. Dairy Sci. 70: 1-12.
 - 10.Crowther, J. R. 1995. ELISA:theory and practice. 1st ed. Humana press Inc. Totowa, New Jersey, USA.
 - 11.Cruz, J. R. and Arevalo, C. 1985. Fluctuation of specific IgA antibodies in human milk. Acta Paediatrica Scandinavia 74: 897-903.
 - 12.Debeaufort, F. and Voilley, A. 1995. Effect of formulation parameters and drying conditions on mechanical and barrier properties of emulsified model edible films. Int. J. Food Sci. Tech., 30(2): 183-190.
 - 13.Donhowe, I. G. and Fennema, O. 1996. Edible films and coatings: characteristics formation,definitions and testing methods. Krochta, J. M. and Baldwin, E. A. Nisperos-Carriedo MO, editors. p. 1-24. Edible coatings and films to improve food quality. Capter1. Techhomic Publishing Co Inc, USA.
 - 14.Dziedzic, J. D. 1988. Microencapsulation and encapsulated ingredients. Food Tech. April: 136-148.
 - 15.Ebina, T., Sato, A., Umezu, K. and Ishida, N. 1985. Prevention of rotavirus infection by oral administration of cow colostrums containing anti-human rotavirus antibody. Medical Microbil. And Immunol. 174: 177-185.
 - 16.Facon, M., Skura, B. J. and Nakai, S. 1993. Potential for immunological supplementation of foods. Food Agric. Immunol. 5: 85-91.
 - 17.Foley, N. and Otterby, S. 1978. Availability, storage, treatment, composition and feeding value of surplus colostrum:a review. J. Dairy Sci.61: 1033-1060.
 - 18.Gennadios, A., Mchugh, T., Weller, C. L. and Krochta, J. M. 1994. Edible coatings and films based on proteins. Edible coatings and films to improve food quality. Capter 9. p. 201-277. Techhomic Publishing Co Inc., USA.
 - 19.Glover, F. A. 1985. Ultrafiltration and Reverse Osmosis for the Dairy Industry. Technical Bulletin 5, National Institute for research in Dairying, Reading, UK.
 - 20.Goldsmith, R. M., Ahlstedt, S., Carlsson, B., Hanson, L.A.,Jodal, U., Lidin-Janson, G.. and Sohl-Akerlund, A. 1975. Antibody-forming cells in human colostrums after oral immunisation. Nature 257: 797-798.
 - 21.Gontard, N., Guilbert, S. and Cuq, J. L. 1993. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. J. Food Sci. 58(1): 206-211.
 - 22.Grant, L. A. and Burns, J. 1994. Application of coating. Krochta JM, Baldwin EA, Nisperos-Carriedo MO, editors. Edible coatings and films to improve food quality. Capter 8. p. 189-200. Techhomic Publishing Co Inc., USA.
 - 23.Greener, I. K. and Fennema, O. 1989. Evaluation of edible,bilayer films for use as moisture barriers for food. J. Food Sci. 54(6): 1400-1406.
 - 24.Gurr, M. I.1981. Review of the progress of dairy science: Human and artificial milks for infant feeding. J. Dairy Res.51: 267-278.
 - 25.Hilpert, H. 1977. Bovine milk immunoglobulins, their possible utilization in industrially prepared infants milk formula. In food and immunology, L. Hambraeus.p.182-196.Almqvist and Wiksell International, Stockholm, Sweden.
 - 26.Hudson, L. and Hay, F.C. 1989. Practical Immunology. 3rd ed. Blackwell Scientific Co., London, UK.
 - 27.Jenness, R. 1988. Composition of milk. In Fundamentals of Dairy Chemistry, 3rd ed. N.P. Noble, p. 1-38. Van Nostrand Reinhold Co., New York, USA.
 - 28.Juma, M. and Muller, B. W. 1999. Phsicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability. Int. J. Pharm. 183: 175-184.
 - 29.Kaneko, T., Wu, B. T. and Nakai, S. 1985. Selective concentration of bovine immunoglobulins and β -lactalbumin from acid whey using FeCl₃. J. Food Sci. 50: 1531-1536.

30. Katsuro, H., Satoshi, K., Hitoki, Y., Rikio, K. and Hiroshi, I. 2000. Detection of cytokines in bovine colostrum. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 76:183-190.
31. Kuby, J. 2002. *Immunology*. 2nd ed. W.H. Freeman Co., New York, USA.
32. Kummer, A., Kitts, D. D., Li-Chan, E., Losso, J. N., Skura, B. J. and Nakai, S. 1992. Quantification of bovine IgG in milk using enzyme-linked immunosorbent assay. *Food Agric. Immunol.* 4: 93-102.
33. Li-Chan, E., Kummer, A., Losso, J. N. and Nakai, S. 1994. Survey of immunoglobulin G (IgG) content and antibody specificity in cow's milk from British Columbia. *Food and Agri. Immunol.* 6: 443-451.
34. Li-Chan, E., Kummer, A., Losso, J. N., Kitts, D. D. and Nakai, S. 1995. Stability of bovine immunoglobulins to thermal treatment and processing. *Food Research International*. 28(1): 9-16.
35. Manuela, E. Pintado, J. A. Lopes da Silva. and Xavier, M. F. 1999. Comparative Characterization of Whey Protein Concentrates from Ovine, Caprine and Bovine Breeds. *Lebensm.-Wiss.u. Technol.* 32: 231-237.
36. Maynes, J. R. and Krochta, J. M. 1994. Properties of edible films from total milk protein. *J. Food Sci.* 59(4): 909-911.
37. Nicholas, P., David, R., Remon, F. and Pessen, H. 1995. Composition factors affecting the water vapor permeability and tensile properties of hydrophilic films. *J. Agric Food Chem.* 43: 1432-1435.
38. Porter, R. R. 1959. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.* 73: 119-123.
39. Pothakamury, U. R. and Barbosa-Canovas, G. V. 1995. Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food Science and Technology*. 6: 397-406.
40. Ribud, M., Hardikar, A., Bhat, S. R. and Bhond, R. 2000b. pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release system for antibiotic delivery. *J. Control Release*. 68: 23-30.
41. Rietschel, E., Holst, O., Brade, L., Muller-Loennies, S., Mamat, U., Zahringer, U. and Beckmann, F. 1996. Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response and immunological detoxification. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 216: 39-81.
42. Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D. 1993. *Immunology*, 3rd. Mosby-Year Book Europe, Inc., UK.
43. SAS. 2001. *SAS User's guide: Statistics*. 8th ed. SAS Inst. Cary, NC, USA.
44. Shimizu, M., Nagashima, H., Sano, K., Hashimoto, K., Ozeki, K., Tsuda, K. and Hatta, H. 1992. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 270-274.
45. Sissons, J. G. P. and Oldstone, M. B. A. 1980. Medical perspective dilling of virus-infected cells: the role of antiviral antibody and complement in limiting virus infection. *J. Infect. Dis.* 142: 442-446.
46. Smith, K. L., Muir, L. A., Ferguson, L. C. and Conrad, H. R. 1971. Selective transport of IgG into the mammary gland: role of estrogen and progesterone. *J. Dairy Sci.* 54: 1886-1894.
47. Tacket, C. D., Losnsky, G., Link, H. and Levine, M. M. 1988. Protection by milk immunoglobulin concentrate against oral challenge with enterotoxigenic *E. coli*. *New Eng. J. Med.* 318: 1240-1243.
48. Tinsley-Bown, A. M., Fretwell, R., Dowsett, A. B., Davis, S. L. and Farrar, G. H. 2000. Formulation of poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) microparticles for rapid plasmid DNA delivery. *J. Control. Rel.* 66: 229.
49. Varnam, H. and Sutherland, P. 1994. *Milk and milk products*. Chapman and Hall, London, UK.
50. Wu, J. P. and Ding, X. L. 2002. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Res. Int.* 35: 367-375.