

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

含人乳鐵蛋白基因乳酸菌轉型株克弗爾粒之開發

Development of kefir grain with lactobacilli transformant carrying human lactoferrin gene

計畫編號：NSC 90-2313-B-002-300

執行期限：90年08月01日至91年07月31日

主持人：林慶文 國立台灣大學畜產學系

共同主持人：陳全木 國立中興大學動物學系

計畫參與人員：盧建宇 國立台灣大學畜產系

一、中文摘要

乳酸菌為具多種保健效果之菌群，利用其表現具生物活性之蛋白質時具有高安全性之優點。以及乳鐵蛋白(lactoferrin)具有多種生理特性可作為添加劑供作營養及治療之用。本研究藉由基因重組技術，將人類乳鐵蛋白基因構築於乳酸菌表現型載體上，再轉型於原生菌*Lactobacillus casei*中，使其具有產製人乳鐵蛋白之能力。首先利用噬菌體殖入人類十二指腸表現基因群之cDNA基因庫，再利用放射性探針雜合反應，經三輪篩選出人類乳鐵蛋白之選殖株，以建立含人乳鐵蛋白之cDNA片段。另一方面，利用資料庫之搜尋及基因之比對，設計一對含有核酸限制酶切位之引子，接著利用聚合酶鏈鎖反應，將人類乳鐵蛋白基因(2.2 kb)次選殖至p-GEMT載體上，經限制酶作用後構築一完整之乳酸菌表現型載體pSD/hLF，再利用電穿孔之方式轉型至*L. casei*中，經抗生素篩選後，獲得兩株乳酸菌選殖株。經萃取胞內之蛋白質後，利用SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳及西方吸漬分析後結果顯示，重組乳鐵蛋白確實成功地被表現於乳酸菌體內。之後再利用不同時間之培養下，萃取乳酸菌內之蛋白粗萃液，經快速蛋白質液相層析系統膠體過濾方式將重組乳鐵蛋白進行初步之純化，結果顯示在培養36-48小時之間，乳酸菌體內有最大乳鐵蛋白之產量。

關鍵詞：乳鐵蛋白、基因工程、乳酸菌

Abstract

The lactoferrin (LF) has been shown to exhibit several physiological functions: (1) LF possesses antimicrobial activity against a variety of bacteria; (2) LF may regulate and facilitate intestinal absorption of iron; (3) LF possesses antioxidant activity. To develop unique dairy products with physiological functionality, we intended to combine probiotics and lactoferrin by genetic engineering to produce probiotics able to express heterologous human lactoferrin cDNA and produce lactoferrin. This study was to begin to clone the human lactoferrin (hLF) gene in human intestinal cDNA library. Using polymerase chain reaction expand hLF gene with designing two primers. Then ligated the hLF gene on intracellular expression vector pSD. The nucleotide sequence of the hLF cDNA was confirmed. Transformant the recombination plasmid into the probiotic (*Lactobacillus casei*) by electroporation. The transformants of *L. casei* were selected by erythromycin. In addition, the probiotic is carrying hLF cDNA to produce lactoferrin. The hLF protein was purified by gel-filtration on the fast protein liquid chromatography and collected hLF at different incubation times. SDS-PAGE analysis showed the most apparent yield at the 48th hour. After the antimicrobial testing, prove the recombinant lactoferrin has the biological activity. In the other experiments, we compared the ability of antibiotic in lactoferrin in different species. And the

bovine lactoferricin shows the better ability of antibiotic than human and porcine lactoferricin. In the future, it can be to use on actual production in industrial process, the mixing disposition will be fine tuned until the quality will achieve commercial conditions of the food industry. This result may provide the basis for the future development of the new style probiotic products (yogurt and kefir) with highly healthy functionality.

Keywords: lactoferrin、gene engineering technology、lactobacillus.

二、緣由與目的

近年來由於發酵乳製品之功能性，逐漸被大眾所肯定，特別是含有原生菌之發酵製品更是受到青睞。再加上國人對健康意識抬頭及生物技術一日千里的情況下，使得擁有許多保健生物功能的乳鐵蛋白(lactoferrin)受到相當之重視。乳鐵蛋白為許多哺乳動物乳汁中主要之單鏈糖蛋白，其最先在牛乳中被發現，而最早由人乳中分離完成，其於乳汁中之含量具種別差異性，人乳中含量豐富(約1mg/ml)。乳鐵蛋白能與鐵結合，屬於轉鐵蛋白(transferrin)家族之一，其對動物體內鐵的運輸扮演重要角色，因其每一分子含有兩處鐵的結合位置，在低pH值的情況下，能與 Fe^{3+} 有高度親合力，並可將鐵吸收儲存於需鐵的細胞，故乳鐵蛋白之濃度與哺乳期之幼小動物腸道之菌叢及鐵離子之吸收代謝有關，乳鐵蛋白可能透過腸道中受體之調節促進母乳嬰兒及哺乳期仔豬鐵離子之吸收，對於發育快速之哺乳期仔豬而言，至少可提供造血所需之鐵離子來源，並減少仔豬貧血的發生率，由於乳鐵蛋白對鐵的高親和力，可與微生物競爭生長所需之鐵而產生抑制的較果。然而，真正達到殺菌的能力是在當乳鐵蛋白進入胃中受到胃蛋白(pepsin)消化後所生成之雙極性肽鏈-乳鐵蛋白素(lactoferricin)。易與細菌之外膜結合並釋出其上之脂多糖(lipopolysaccharide)而使滲透壓改變而造成菌體之死亡。根據實驗結果顯示，乳鐵蛋白素對格蘭氏陽性、格蘭氏陰性菌、酵母菌及黴菌等均有抑制生長之效果。另一方面，乳鐵蛋白透過與鐵離子之結合功

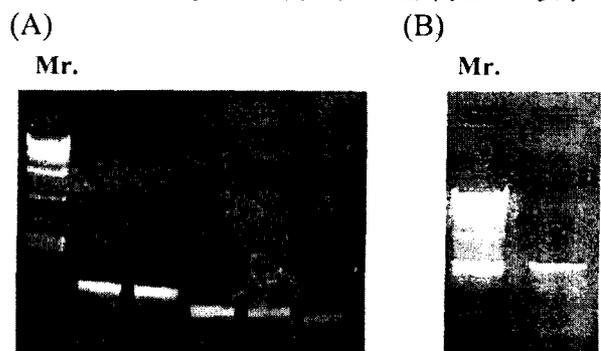
能，可減少游離鐵所催化之自由基(free radical)產生及減少脂質過氧化作用所引起之細胞膜損傷，故具有抗氧化之生物功能，對於維護動物健康扮演重要角色，因此極可能被開發為健康食品醫藥製品之乳成分。

乳鐵蛋白既然如此具有營養價值與治療功效，至今仍未被大量使用，乃因目前尚無法以有效率及節省成本之方法，以商業化大量生產出具有生物活性的乳鐵蛋白供人類使用，本實驗之目的在於利用基因工程及微生物技術，使乳酸菌攜帶人乳乳鐵蛋白之基因，並能在發酵飲料中生產乳鐵蛋白，增加營養價值，最後與酵母菌共同培養，生產更具保健療效之酒精發酵乳飲料-克弗爾，冀能對人類腸胃道吸收及免疫機能之改善有所幫助。

三、結果

(一)、人類乳鐵蛋白基因於乳酸菌表現型載體之建構

直接利用設計含有內切酶切位之上、下游引子，於cDNA基因庫中萃取總量噬菌體DNA，以噬菌體內所含之總量基因作為模板，擴增人乳鐵蛋白基因，設計一限制酶BglII為限制酶切位之引子，經PCR反應後，經電泳後與 $\lambda/Hind III$ DNA marker 進行比對，可發現於2.2 kb 處出現一電泳帶，此結果顯示擴增後所複製出之PCR產物與hLF片段長度一致(圖一)，經pGEM-T載體進行次選殖並定序結果無誤後，進行與乳酸菌載體之建構。



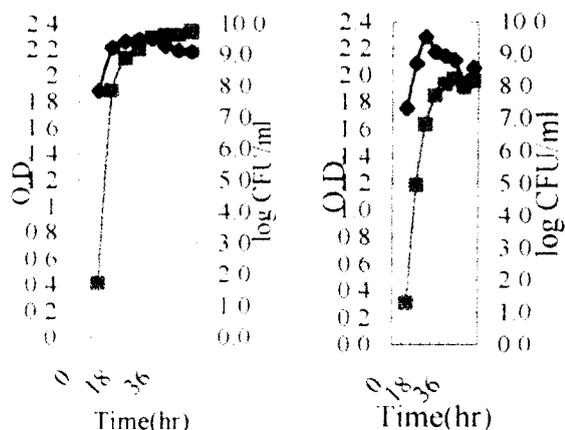
圖一、(A)噬菌體選殖株之DNA萃取與嵌入片段之PCR擴增反應；(B)人類乳鐵蛋白cDNA完整片段(2.2kb)之PCR擴增選殖。

(二)、含人乳鐵蛋白基因乳酸菌菌株之轉型及篩選

本次實驗原本採用兩株原生菌株，分別為 *Lactobacillus acidophilus* 及 *L. casei*，作為宿主細胞。轉型前先將製備勝任細胞，其目的可使宿主提高對質體之攝入能力，電穿孔作用時為使細菌處於高電場下，造成菌膜瞬間產生極微小之孔洞，通透性增加而使質體DNA得以進入乳酸菌中。

(三)、乳酸菌選殖株之培養及重組蛋白之萃取

經過6、12、18、24、30、36、42、48小時後吸光值及菌數曲線圖如圖二，結果顯示，在起始6小時之O.D.值及菌數皆為原始菌株較高，並且原始菌株在第18小時便進入定常期，其O.D.值及菌數皆在24小時後表現穩定，而由轉型株之生長曲線可看出，其生長之速度較緩慢，無較明顯之定常期後一平坦之曲線，且在36小時後，菌數有較大之下降趨勢，由於轉型株並無誘導物之作用，推測此原因可能為在產製乳鐵蛋白時，對生長所造成之影響。



圖二、*actobacillus casei* 原始菌株與轉型菌株之生長曲線及菌數之比較。

(四)、乳酸菌選殖株內hLF之萃取

為確認重組乳酸菌於細菌內表現hLF蛋白質之能力，因此利用MRS broth培養後，收集乳酸菌液，經離心後，保留菌體並加入酸洗玻璃珠及緩衝液，利用振盪器振破菌體之後，萃取胞內蛋白質，經濃縮離心管回收後，以7.5% SDS-聚丙醯膠體電泳分析，以原始菌作為對照組的實驗中，可在圖三膠片中看到在78 kDa處有蛋白質之表現，而原始菌株在此處則無明顯蛋白質色帶之存在。



圖三、SDS-聚丙醯蛋白質電泳膠體分析 hLF 乳酸菌轉型株與正常乳酸菌之蛋白質表達分析。

(五)、重組乳鐵蛋白之初步純化

經過 SDS-PAGE 及西方吸漬分析結果，確定乳鐵蛋白可表現於乳酸菌體內，但菌體內之其他蛋白質過多，可能會對乳鐵蛋白之判讀造成影響；且需更確定在不同時段乳鐵蛋白在菌體內之表現量，採集第0、12、24、36、48、60及72小時之乳酸菌液，利用酸洗玻璃珠及超音波兩種方式來破壞菌膜，萃取菌內之重組乳鐵蛋白。將萃取之菌液經濃縮至200 μ l之後，利用蛋白質快速液相層析系統(FPLC)，其蛋白質表現波峰之變化如圖四所示。依分子量大小之不同，將濃縮菌液作初步分離，收集各波峰之蛋白質收集液進行 SDS-PAGE 電氣泳動分析，結果在不同時段收集之蛋白質溶液，在第11、12管附近有與人乳鐵蛋白相近之蛋白質色帶，並經西方吸漬分析確認為重組人乳鐵蛋白後，收集所有不同時段之蛋白質分離產物進行比較(圖五)，結果顯示於第36及48小時，具有較明顯之蛋白質色帶之產生，之後產量又逐漸減小，在 FPLC 分析系統之分析圖上也顯示出，36及48小時在第11及12管附近有較高之波峰產生，故推測乳酸菌在36至48小時之時間內，可產製較大量之人乳鐵蛋白，但由之前菌數測定結果顯示，大量之乳鐵蛋白可能會對乳酸菌之生長造成影響，大量之乳鐵蛋白推積於菌內可能會改變菌體之正常生理，而造成菌數之下降，故未來之方向可以考慮嘗試不同之乳酸菌株作為產製乳鐵蛋白之宿主細胞，並在產品的製造過程中調整發酵之時間以獲得最大之菌數及蛋白質產量。

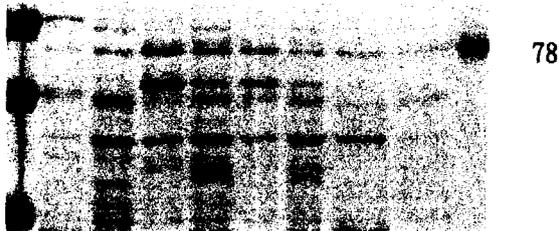
酵乳製品之開發。

五、參考文獻

- Arnold, R. R., M. Brewer, and J. J. Gautier. 1980. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect. Immun.* 28:893-898.
- Balmer, S. E., P. H. Scott, and B. A. Whaton. 1989. Diet and fecal flora in the new-born: lactoferrin. *Arch. Dis. Child.* 64: 1685-1690.
- Baker, E. N., S. V. Rumball, and B. F. Anderson. 1987. Transferrin: insight into structure and function from studies on lactoferrin. *Trends Biochem. Sci.* 12: 350-353.
- Lönnerdal, B. 2000. Clinical studies on lactoferrin added to infant formula. *Lactoferrin: Structure, Function and Application.* Amsterdam; New York: Elsevier Science B.V. p.291-299.
- Masschalck, B., R. V. Houdt, and C. W. Michiels. 2001. High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. *Int. J. Food microbial.* 64: 325-332.
- Russell, W. M. and T. R. Klaenhammer. 2001. Efficient system for directed integration into the *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus gasseri* chromosomes via homologous recombination. *Appl. Environ. Microbiol* 67(9): 4361-4364.
- Wei, M. Q., C. M. Rush., J. M. Norman., L. M. Hafner., R. J. Epping, and P. Timms. 1995. An improved method for the transformation of *Lactobacillus* strains using eletroporation. *J. Microbio. Methods.* 21: 97-109.

圖四、FPLC之不同培養時序分析。

Mr. 12 24 36-1 36-2 48-1 48-2 60 72 hLF



圖五、SDS-聚丙烯醯電泳膠體分析經FPLC蛋白質快速液相層析後，不同培養時序之人乳鐵蛋白分析情形。

(六)克弗爾轉殖粒之試製及分析

將乳酸菌轉殖株與克弗爾粒共同培養下，進行克弗爾產品之試製。經過一星期之連續接種後，取克弗爾粒(kefir grain)，經均質、振碎後再分析乳鐵蛋白之產量。結果發現在78kDa的位置具有與純化之人乳鐵蛋白相近之色帶，也証明了乳鐵蛋白可成功轉殖於克弗爾之中。但其表現之量不高，未來可改用其他表現較佳之乳酸菌及更強之表現型載體來改善此一問題。

四、討論

本試驗係以構築一乳酸菌表現載體，開發具產製人乳鐵蛋白之乳酸菌為目標，並進行產品之研發，其結果歸納如下：

- 一、重組乳酸菌確實可於胞內產製外來蛋白質，利用此一系統可表現人乳鐵蛋白，以期達到經濟生產及產品應用之目的。
- 二、乳鐵蛋白的表現量，以培養36-48小時之時段具最高，但造成乳酸菌數之下降。可能為乳鐵蛋白在菌體內含量過高對乳酸菌之生長所造成之影響。
- 三、乳鐵蛋白可成功轉殖於克弗爾之中。未來可利用此一轉殖株進行其他發