

# 中華民國第 58 屆中小學科學展覽會 作品說明書

---

高級中等學校組 動物與醫學科

## 團隊合作獎

052014

尋找降解麩蛋白和  $\alpha$ -gliadin 之酶以治療麥麩過敏症

學校名稱：臺中市立臺中第一高級中等學校

作者：  高二 沈弘祥  高二 王上恩	指導老師：  龔雍任
---------------------------------	------------------

關鍵詞：麥麩過敏症、分解酵素、 $\alpha$ -gliadin

## 摘要

麥麩過敏症的過敏主因為小麥內的麥醇溶蛋白(gliadin)。多數患者對  $\alpha$ -gliadin 過敏。此症仍無法被治癒，目前主要以無麥麩飲食應對。我們從自然界找到分解 gliadin 的細菌，並測試其分解能力。首先，我們取得若干菌種，利用 gliadin 培養基初步確認是否分解 gliadin，得到二十種細菌，並以 PCR 及核酸定序找出菌的名稱。再使用 gliadin 培養基與 zymogram 比較各細菌酵素分解 gliadin 的能力，篩至五種菌，又以質譜儀找出酶的名稱。再以銀染實驗比較目標菌種之酵素分解  $\alpha$ -gliadin 的效果，篩至三種菌。最後於胃中酸鹼值環境定量測試三種菌酵素及緩解麥麩過敏症之成藥(gluten ease)分解  $\alpha$ -gliadin 能力。本研究最終得到三株於胃中酸鹼值仍能降解  $\alpha$ -gliadin 的細菌，分別為：Burkholderia sp.1、Dyella sp.1、Dyella sp.2。未來有機會將酵素開發成治療麥麩過敏症的藥品。

## 壹、研究動機

麥麩，是一種普遍存在於大部分麵粉製品的蛋白質。麥麩過敏症則是因人體對麥麩不正常的免疫反應所致。麥麩過敏症在亞州尚未被積極研究，然而卻是西方人常見的一種疾病，在美國的盛行率約 0.1%(Schoenstadt, 2017)。其致病機制為：麥麩進入消化道時會水解成麥醇溶蛋白(gliadin)和穀蛋白(glutenin)，而 gliadin 裡一種特殊蛋白  $\alpha$ -gliadin 被體內酵素分解成短肽鏈、經過修飾並與其他蛋白質結合，此時患者體內特有的抗體會辨識出此物質，而產生一連串過敏反應(Helene Arentz-Hansen,2000)。此疾病衍生出的症狀包括腹脹、腹痛、腹瀉、嘔吐、胃潰瘍等等。

目前此疾病仍無法治癒，西方國家主要以無麥麩飲食應對(Nicole Puglise, 2016)，也就是避免吃進任何含有麥麩的食物。然而這代表患者無法享用諸如麵條、麵包、比薩等常見的食物，使患者不僅失去進食的樂趣，更嚴重影響日常生活。再者，雖然許多食品公司已推出無麥麩食品，但價格大多昂貴。

而當今市面上針對麥麩過敏症所賣的藥物皆只能減輕患者誤食少量麥麩時產生的過敏反應，並不能真正解除此疾病對他們帶來的困擾。我們因此想由學校所學「酵素在食品上的應用」、「動物的消化與吸收」、「人體的防禦」等章節為基礎，從自然界的細菌中找到可分解  $\alpha$ -gliadin 的酵素，找出其名稱並比較分解  $\alpha$ -gliadin 的成效。期許未來能將此次研究結果開發成藥物，幫助深為此病所苦的人。

## 貳、研究目的

- 一、找出能分解麥麩的細菌
- 二、找出該菌的酶名稱
- 三、比較酶分解能力

## 參、研究器材及設備

### 一、藥品

- (一) 中筋麵粉
- (二) 鹽
- (三) 70%酒精
- (四) PCR 引子：1492R、27F
- (五) Binding solution、Wash solution、elution solution (from Plus DNA Clean/ExtractionKit from Gene Mark)、green buffer
- (六) Gliadin from Wheat G3375-25G (from SIGMA-ALDRICH)(圖 1)
- (七) Silver complex solution、Image development reagent、Development accelerator reagent、Reduction moderator solution、Fixative Enhancer、Concentrate(Silver Stain Plus from BIO-RED)
- (八) Coomassie blue、washing buffer、incubation buffer、sample buffer
- (九) Acrylamine 溶液、APS(Ammonium persulfate)
- (十) TEMED(Tetramethylethylenediamine)
- (十一) CMM 培養液(pH6)
- (十二) 冰醋酸(pH4)、甲醇
- (十三) 10%SDS 溶液
- (十四) SAMPLE DYE(表 1)
- (十五) gel buffer (pH8.45)( 1MTris-Base 363.42g/L、0.1%SDS 3g/L )
- (十六) Cathode 上膠電解質 pH8.25(1MTris-Base 121.14g/L、1M Tricine 179.2g/L、1%SDS 10g/L)
- (十七) Anode 下膠電解質 pH8.9(0.1MTris-Base 121.14g/L)
- (十八) GlutenEase(圖 2)



圖 1、gliadin

表 1、SAMPLE DYE 成分

藥品	劑量
SDS(8%)	2.4g
DTT(8mM)	240ul
Glycerol(16%)	4.8ml
Tris-HCL(0.16M)	0.58g
Bromophenol blue 0.04%	0.12g
Urea(3.2M)	5.76g
Urea(8M)	14.4g



圖 2、GlutenEase

### 二、器皿用具

- (一) 不織布袋、臉盆、鏟子、玻璃盒
- (二) 秤量紙、秤藥皿、刮勺、磁石
- (三) 燒杯、解剖剪、量筒、濾紙、玻棒、鑷子
- (四) 培養皿、接種環、微量滴管
- (五) 試管、試管架、試管刷、離心管、PCR 管
- (六) Spin column、Collection tube
- (七) 電泳玻片、氧化鋁片、間隔條、齒梳、製膠台、電泳槽

### 三、儀器設備

- (一) 水平震盪器、無菌操作台
- (二) 果汁機、離心機、超音波震盪儀、均質器
- (三) 電子秤、加熱攪拌器、高溫滅菌箱、烘箱
- (四) 培養箱、震盪培養器
- (五) 聚合酶連鎖反應儀、真空濃縮機、分光光度計
- (六) UV 切膠觀察箱、UV 照膠觀察箱

## 肆、研究過程或方法

### 一、研究架構(圖 3)



圖 3、研究架構

### 二、研究過程和方法

#### (一) gliadin 來源

##### 1. 自製 gliadin：用於初步實驗

- (1) 將麵粉與鹽以三比一的比例混合並加入適當的水搓揉成團。
- (2) 將麵團放入不織布袋裡以流水沖洗搓揉到變成富彈性團狀物。
- (3) 將麵筋置於 70%酒精中搓洗，洗至呈細小塊狀。
- (4) 將混合物以 10000g 離心 10mins，取出上清液倒於塑膠膜上自然風乾，風

乾後膜上塊狀物即為 gliadin。

2. 現成 gliadin：用於要求精確度之實驗

SIGMA 販售之現成 gliadin(圖 1)。

## (二) 尋找可分解 gliadin 的細菌

1. 自然生長

- (1) 於中興大學校園選取六處地點各埋入 40g 的自製 gliadin。
- (2) 放置 1 個月優化土壤，使土壤中可分解 gliadin 的細菌大量繁殖以增加找到目標菌的機率。
- (3) 一個月後挖取該地的土壤。

2. 食蟲植物

採集捕蟲堇(*Pinguicula*)、彩虹草(*Byblis*)沾附著黏液的莖葉。

3. 麵粉為食的昆蟲

- (1) 剪取 50 隻麵包蟲(*Tenebriomolitor*)的下半身，加適量培養液以果汁機打碎。
- (2) 蒐集 40 隻菸甲蟲(*Iasiodermaserricornes*)(圖 4)，加適量培養液以均質器絞碎。



圖 4、菸甲蟲

4. 其他

採取各種我們認為可能有目標菌存在或具有特殊條件之地點的樣本。

## (三) 製作 gliadin 培養基

1. 將培養液置於 121°C、1.16atm 的高溫滅菌箱滅菌 30mins。
2. 待培養液放涼後，取數個培養皿均勻倒入 20~25mL 的培養液。
3. 待培養皿靜置凝固即完成。

## (四) 初步確認採集的菌是否分解 gliadin

1. 取適量採集樣本加入 20mL 培養液震盪，再以 4°C、9000RPM 離心 10mins 得上清液。
2. 將上清液塗盤(gliadin 培養基)並放入 28°C 恆溫箱培養。
3. 一天後觀察培養皿是否出現代表分解了 gliadin(霧白色)的透明圈產生。

## (五) 冷凍儲菌

1. 將確認有分解 gliadin 能力的菌種刮取一粒菌落再次塗盤 gliadin 培養基。
2. 將新培養基放入 28°C 恆溫箱培養。

3. 一天後從新培養基刮取一粒菌落放入 gliadin 培養液。
4. 加入甘油並置於-80°C 保存。

#### (六) 細菌定序

1. PCR 大量複製 16S。

配製 sample(表 2)，並進行 PCR(圖 5)。

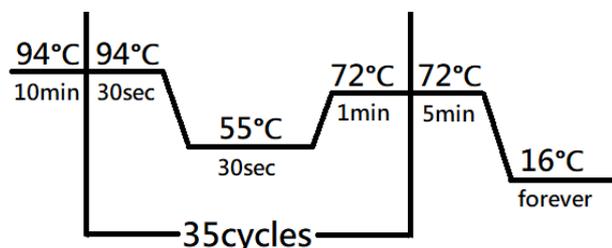


圖 5、PCR 流程

表 2、sample 成分

藥品	劑量
ddH <sub>2</sub> O	36ul
10X Taqbuffer	5ul
2.5uM dNTP	5ul
10uM 1492R Primer	1ul
10uM 27F Primer	1ul
Taq	1ul
Colony	≈ 1ul

2. 膠體電泳確認 PCR 是否成功。

- (1) 將 1% agarose、EtBr(3μL/100mL) 洋菜膠倒入製膠盒待凝固備用。
- (2) 吸出 PCR 完成的 DNA(5μL) 與 green buffer(1μL) 染劑混合。
- (3) 分別將染色的 DNA 滴入膠體的凹孔內。
- (4) 跑電泳 130v、30mins。
- (5) 將跑完電泳的膠體放入 UV 照膠觀察箱中觀察明帶是否介於 1.6kb。

3. 送交中興大學核酸定序實驗室代為定序。

- (1) 在 UV 切膠觀察箱下將洋菜膠的明帶割下分別裝入離心管。
- (2) 加入 binding solution(所割洋菜塊體積的 2 倍) 並置於 65°C 待洋菜塊溶解。
- (3) 倒入由 spin column、collection tube 組成的管，並以 14000g 離心 1mins。
- (4) 倒掉 collection tube 中廢液，加入 wash solution 700μL 以 15000g 離心 1mins，並重複此步驟一次，最後再以 15000g 離心 5mins。
- (5) 倒掉 collection tube 中廢液，加入 65°C 的 elution solution 40μL 離心 2mins。
- (6) 將此液送定序。

4. 將讀出的核酸序列於 NCBI 網站比對菌種。

#### (七) 比較於培養基中分解 gliadin 能力的強弱

1. 將 gliadin 培養基(酸鹼值分別為 pH3.5、4、5、6、7) 均勻鋪上直徑 6mm 的圓形濾紙(7 片/個)。
2. 取各種菌液 1mL 分別滴入離心管，並以 18000g 離心 10mins 得上清液。
3. 取 40μL 的各菌上清液分別滴於每片濾紙上。

4. 置於 28°C 恆溫箱使其分解一天。
5. 用 multi gauge(WinSite)測量透明圈直徑。

#### (八) 酵素活性測試(zymogram)

1. 製膠(表 3)。

表 3、zymogram 膠成分

上膠	劑量	下膠	劑量
Tris (0.5M,pH6.8)	1.25mL	Tris(1.5M,pH8.8)	2mL
Acrylamide	0.67mL	Acrylamide(30%)	2mL
ddwater	3.075mL	ddH <sub>2</sub> O	2mL
SDS(10%)	50 μL	Gliadin	2mg
APS(10%)	50 μL	SDS(10%)	80 μL
TEMED	10 μL	APS(10%)	80 μL
		TEMED	10 μL

2. 取原菌液 1mL 以 18000g 離心 10mins 得上清液。
3. 取上清液 20μL 加入 sample buffer 於 4°C 以 150V 電泳 120mins。
4. 重複兩次於 washing buffer 於 4°C 搖晃 30mins，再於 incubation buffer 搖晃 60mins。
5. 於 Coomassie blue 搖晃 30mins 染色。
6. 割下透明帶送交中興大學生物科技發展中心——蛋白質譜分析部門定序。

#### (九) 比較於 SDS-page 分解 gliadin 能力的強弱

1. 配製三種不同氮源的培養液(表 4)。

表 4、不同氮源的培養液成分

類別	ddwater(mL)	氮源
CMM	3	1mL CMM、1mL LB
NH <sub>4</sub> Cl	1	4mL NH <sub>4</sub> Cl
NaNO <sub>3</sub>	1	4mL NaNO <sub>3</sub>

2. 將 2、7、9 號菌刮取一粒菌落加於三種培養液，於 28°C 培養三天。
3. 取菌液 5mL 以 18000g 離心 10mins 得上清液。
4. 將上清液做 zymogram。(步驟同實驗(八)，且從此部分之後為使品質穩定改用現成 gliadin(圖 1)，不再是自己手搓)
5. 將 2、7、9、13、20 號菌液(於 CMM 培養)1mL 以 18000g 離心 10mins 得上清液。
6. 用分光光度計測量各號菌上清液、gliadin 液蛋白濃度。
7. 以測得濃度最稀之上清液為基準，將其餘菌液加入醋酸緩衝液(pH4)調至濃度相等，gliadin 液濃度調至最稀菌液的 10 倍。

8. 各取 10 $\mu$ L 的 7.菌液及 gliadin 液混合，並置於 37 $^{\circ}$ C 反應。
9. 於 0、4 小時取每種反應液各一管，加入 5 $\mu$ L 的 SAMPLE DYE，於 60 $^{\circ}$ C 加熱 30mins。
10. 以 tricine SDS-page 並用銀染觀察分解結果。
  - (1) 將電泳玻片、氧化鋁片、間隔條、齒梳浸泡濃硝酸一天，再以 ddwater 洗淨。
  - (2) 以(1)之器具製膠(表 5)。

表 5、上下膠成分

上膠	劑量	下膠	劑量
Acrylamine(30%)	0.275(mL)	Acrylamine(30%)	1.2(mL)
Gel buffer	0.5(mL)	Gel buffer	1.2(mL)
ddwater	1.225( $\mu$ L)	Glycerol	0.286(mL)
APS(10%)	15( $\mu$ L)	ddwater	0.914(mL)
TEMED	1.5( $\mu$ L)	APS(10%)	18( $\mu$ L)
		TEMED	1.8( $\mu$ L)

- (3) 膠體架上電泳槽並滴入 7.、9.之各管(純上清液、反應 0 小時、反應 4 小時)。
- (4) 加滿 Anode Buffer、Cathode Buffer，以 30V 電泳 20mins；再以 130V 電泳 50mins。
- (5) 割除上膠，加入固膠液(表 6)搖晃 20mins，再以純水搖晃 10mins 兩次。

表 6、固膠液成分

藥品	劑量(mL)
甲醇	25
冰醋酸	5
Fixative Enhancer Concentrate	5
ddwater	15

- (6) 加入染劑(表 7)，待膠體充分上色後加入 5%醋酸終止反應。

表 7、染劑成分

藥品	劑量
Sliver Complex Solution	1.25(mL)
Image Development Reagent	1.25(mL)
Reduction Morerator Solution	1.25(mL)
Developemnt Accelerator Reagent	0.625g
ddwater	21.25(mL)

11. 以 image J(National Institutes of Health)測量平均灰階值。
12. 另外以 zymogram 測試，實驗步驟同(八)，惟反應環境值降低至 pH2.5。

## (十)胃環境測試

實驗步驟同(九)，惟反應環境 pH 值降低至 3.5 並三重複。而 gluten ease(圖 2)也新增成一組實驗組。此實驗為定量實驗，將各組實驗數據以 image J(National Institutes of Health)測量平均灰階值，再以圖 17 之公式換算，並以 Excel 軟體進行分析。三重複的數據平均值之間的差異以 t-test 計算。各處理組之間在 p 值小於 0.05 時被認為是有意義的統計上顯著差異。

## 伍、研究結果

### 一、尋找可分解 gliadin 的細菌

找菌的方法為：若此菌可分解 gliadin，便會在白色的培養基上形成菌落與透明圈(圖 6)。

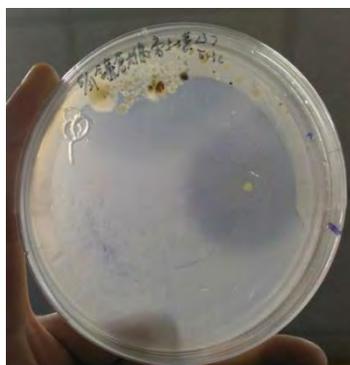


圖 6、透明圈

自然生長的部分沒有找到任何細菌。食蟲植物的部分，捕蟲堇的培養基有透明圈產生(圖 7-a)，但沒有觀察到菌落，代表是植物的酵素分解了 gliadin，而非細菌；彩虹草的培養皿則成功觀察到有菌落與透明圈產生(圖 7-b)。

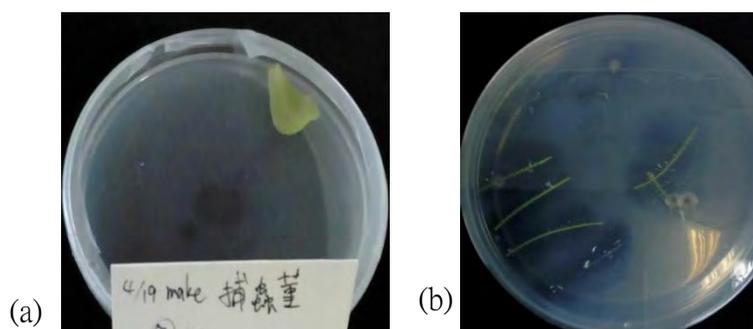


圖 7、食蟲植物 (a)、捕蟲堇 (b)、彩虹草

麵粉為食的昆蟲的部分，麵包蟲和菸甲蟲的培養基皆有觀察到透明圈和菌落。

(圖 8-a、圖 8-b)。

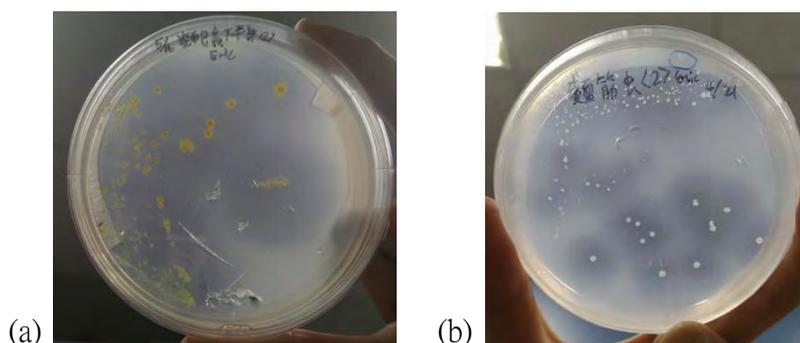


圖 8、麵粉為食的昆蟲 (a)、麵包蟲 (b)、菸甲蟲

其他的部分則從蜂巢花粉、泡麵、石礫土壤、竹林土壤、雞舍土壤、鴨舍土壤、鵝舍土壤、仁義潭土壤皆有得到菌株。結果為：在所有蒐集的細菌中，我們共蒐集到 20 株初步認定有分解 gliadin 的菌。

## 二、定序結果

我們將蒐集到的 20 種菌進行 PCR 增幅 16S rRNA 基因片段後定序分析。定序結果見表 8。

表 8、定序結果

編號	來源	菌種	備註
1	蜂巢花粉	真菌	
2	彩虹草	<i>Burkholderia sp.1</i>	
3	泡麵 I	<i>Pseudomonas sp.1</i>	菌落成黃色
4	泡麵 II	<i>Pseudomonas sp.2</i>	菌落成白色
5	麵包蟲 I	<i>Pseudomonas sp.3</i>	取麵包蟲下半部
6	麵包蟲 II	<i>Pseudomonas sp.4</i>	取麵包蟲內臟
7	石礫土壤	<i>Dyella sp.1</i>	
8	竹林土壤	<i>Serratia sp.1</i>	
9	餵水	<i>Dyella sp.2</i>	
10	鵝舍土壤	<i>Pseudomonas sp.5</i>	
11	雞舍土壤	<i>Pseudomonas sp.6</i>	
12	雞毛	真菌	
13	鴨舍土壤 I	<i>Serratia sp.2</i>	菌落成粉色
14	鴨舍土壤 II	<i>Aeromonas sp.1</i>	菌落具光澤
15	菸甲蟲 I	<i>Serratia sp.3</i>	透明圈大
16	菸甲蟲 II	<i>Serratia sp.4</i>	透明圈較小
17	仁義潭土壤 I	<i>Serratia sp.5</i>	菌落成白色
18	仁義潭土壤 II	<i>Serratia sp.6</i>	菌落成紅色
19	雞舍土壤 I	<i>Bacillus sp.1</i>	LB培養基成白色
20	雞舍土壤 II	<i>Pseudomonas sp.7</i>	LB培養基成綠色

### 三、比較於培養基中分解 gliadin 能力的強弱

我們以 multi gauge 軟體測量透明圈直徑，並輔以觀察透明圈澄清度來當作此階段篩選的方法。

本實驗以找細菌為主，單一菌種如 2 號、7 號、9 號、19 號全數保留，惟 14 號是病原菌，避免危險所以刪除。

針對是真菌的 1 號和 12 號，觀察到在環境低於 pH6 都不分解，而在 pH7 的分解情況 1 號勉強勝過 12 號(圖 9-a、圖 9-b.)所以予以保留。

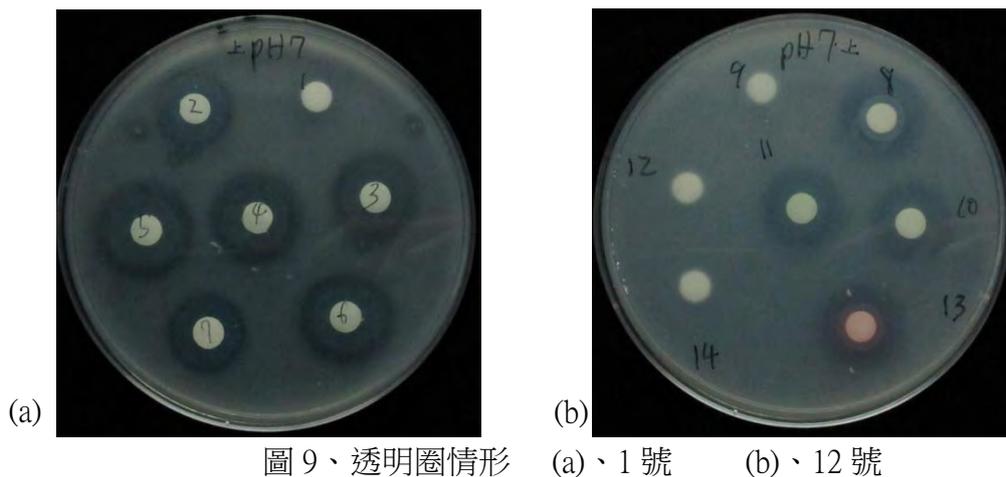


圖 9、透明圈情形 (a)、1 號 (b)、12 號

而菌種重複的 8 號、13 號、15 號、16 號、17 號、18 號雖然皆為 *Serratia*，但觀察到 8 號在 pH5 以上相對於同種菌沒有產生粉紅色圓環(圖 10)，我們覺得或許品系不同所以予以保留。

細菌編號 \ pH	8	13	15	16	17	18
5						
6						
7						

圖 10、*Serratia* 各編號於 pH5 以上的分解差異

同屬 *Serratia* 的 13 號、15 號、16 號、17 號、18 號，因為 13 號在 pH3.5、pH4 的透明圈直徑最大(圖 11)，所以只保留 13 號。

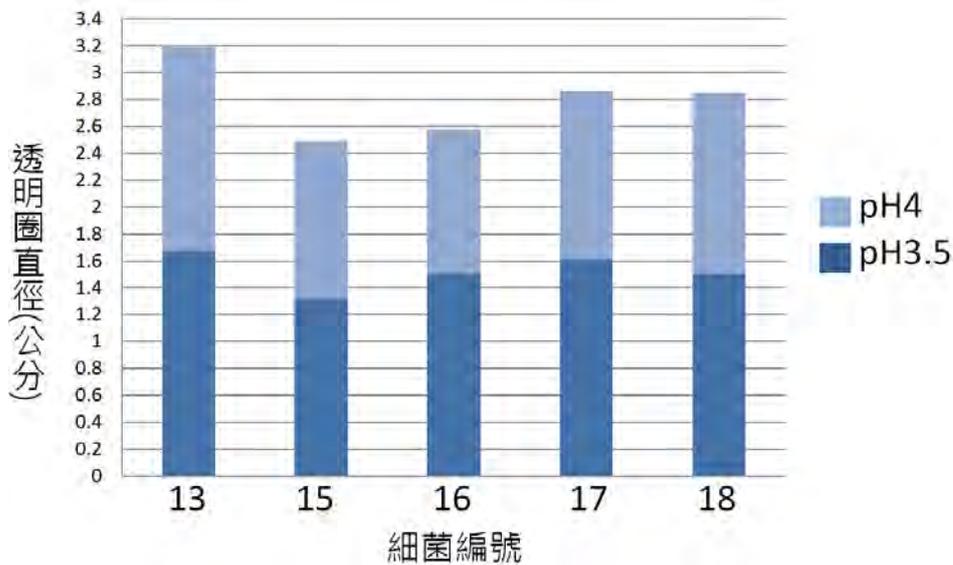


圖 11、*Serratia* 各編號於 pH3.5、pH4 的透明圈直徑

同屬 *Pseudomonas* 的 3 號、4 號、5 號、6 號、10 號、11 號、20 號，因為 20 號在 pH3.5、pH4 的透明圈直徑最大(圖 12)，所以只保留 20 號。

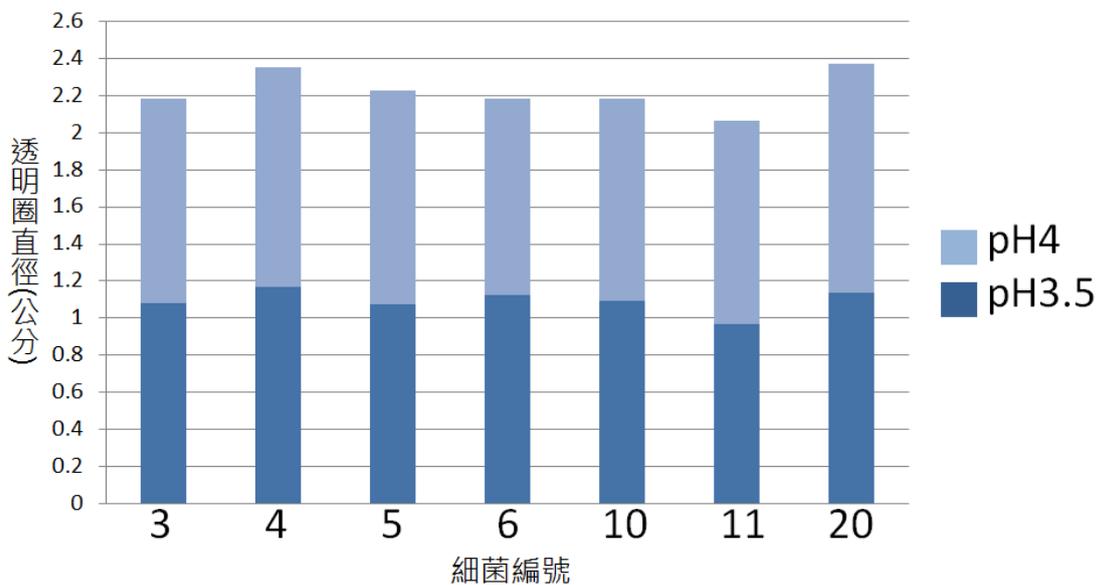


圖 12、*Pseudomonas* 各編號於 pH3.5、pH4 的透明圈直徑

此部份我們將 20 種菌篩選至 8 種，分別為 1 號、2 號、7 號、8 號、9 號、13 號、19 號、20 號。

#### 四、酵素活性測試(zymogram)

前面實驗為粗略篩選，接著我們進一步以 zymogram 篩選。膠體上出現明帶代表該區的蛋白質被酶分解殆盡。

菌種皆為 *Serratia* 的 8 號、13 號在 zymogram 的明帶分佈幾乎一模一樣(圖 13-a、圖 13-b)，我們決定參考圖 10 的結果選最貼近該菌一般色澤(Haiyan, 2011)的 13 號。

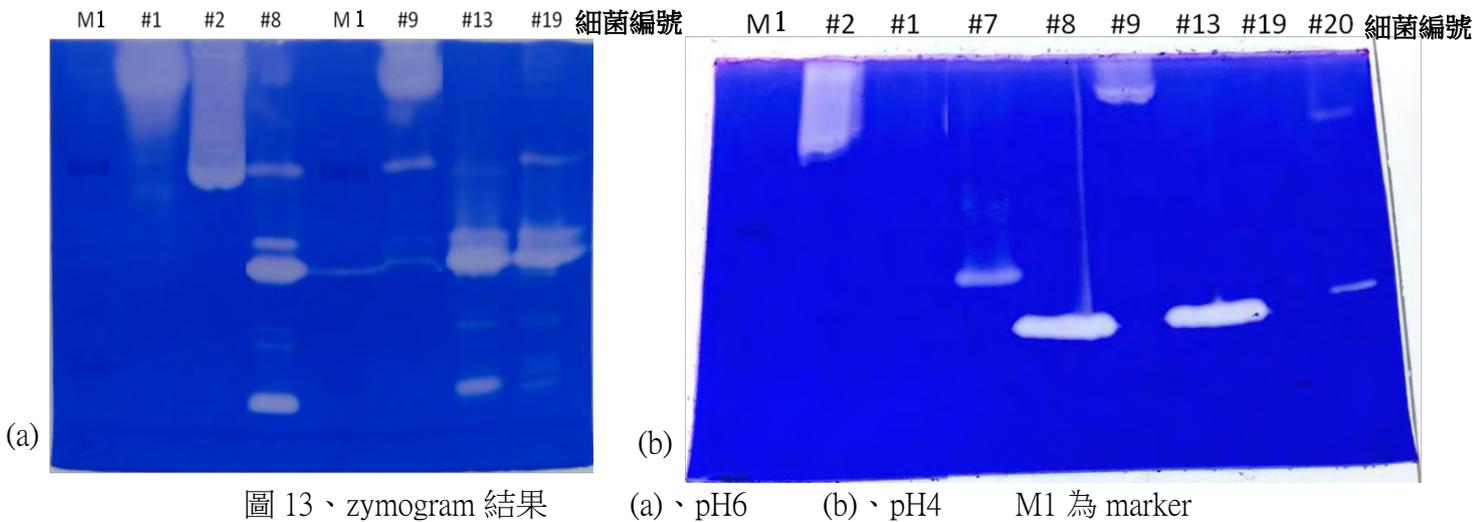


圖 13、zymogram 結果 (a)、pH6 (b)、pH4 M1 為 marker

1 號、19 號在 pH4 時幾乎不分解(圖 13-b)，不符合我們找菌的最終目的因而刪除。此部份我們將 8 種菌篩選至 5 種，分別為 2 號、7 號、9 號、13 號、20 號。

我們同時將 zymogram 的明帶割下以質譜儀定序，目前結果得知 2 號菌分泌的酵素包含胜肽酶 alpha、胜肽酶 beta。

#### 五、銀染前測實驗——不同氮源酶之差別

本實驗的意義為：因後續的實驗需用銀染測定蛋白質濃度以進行最後的篩選，但顧慮原本 CMM 培養液中作為氮源的 casein 若分解不完全，可能會影響結果深淺的測定，所以我們想嘗試使用非蛋白質的氮源替換 casein，測試細菌在不同氮源環境生長、分泌酶之分解能力是否改變。若差別不大，即可以其他氮源取代 casein 以避免染色時干擾。因為屬於前測實驗，我們僅隨機挑選 2 號、7 號、9 號菌做實驗。

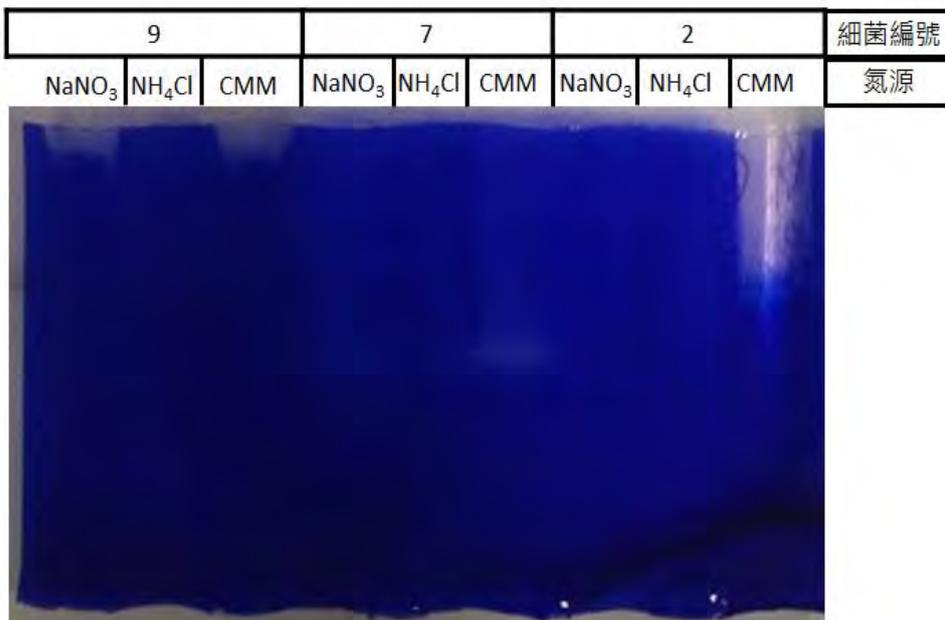


圖 14、zymogram 結果

由圖 14 可知 2 號只在 CMM 培養液下分泌的酶才能有效分解 gliadin；7 號在 CMM 培養液下分泌的酶有作用；9 號在 CMM 培養液、NaNO<sub>3</sub> 培養液下分泌的效果差不多。所以只有在 CMM 培養液生長下，菌分泌的酶種類、能力才會符合之前實驗結果，所以後續實驗皆繼續使用 CMM 培養液養菌。

#### 六、比較於 SDS-page 分解 gliadin 能力的強弱(銀染)

此部分為最後一次篩菌：以銀染測量 gliadin 剩餘量做決定。從此部分我們開始只針對  $\alpha$ -gliadin 探討。 $\alpha$ -gliadin 的大小約在 31~43kda(F. Maurano, 2001)，在 marker 1 大約在第 6 至 8 條條紋之間(圖 15-a)；在 marker 2 大約在第 1 至 2 條條紋之間(圖 15-b)。

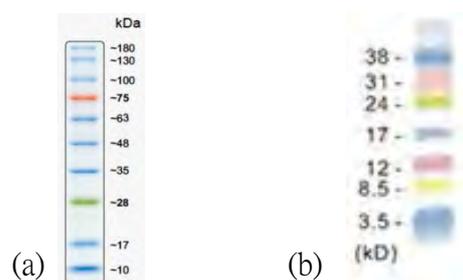


圖 15、marker 大小對照 (a)、marker1 (M1) (b)、marker 2 (M2)

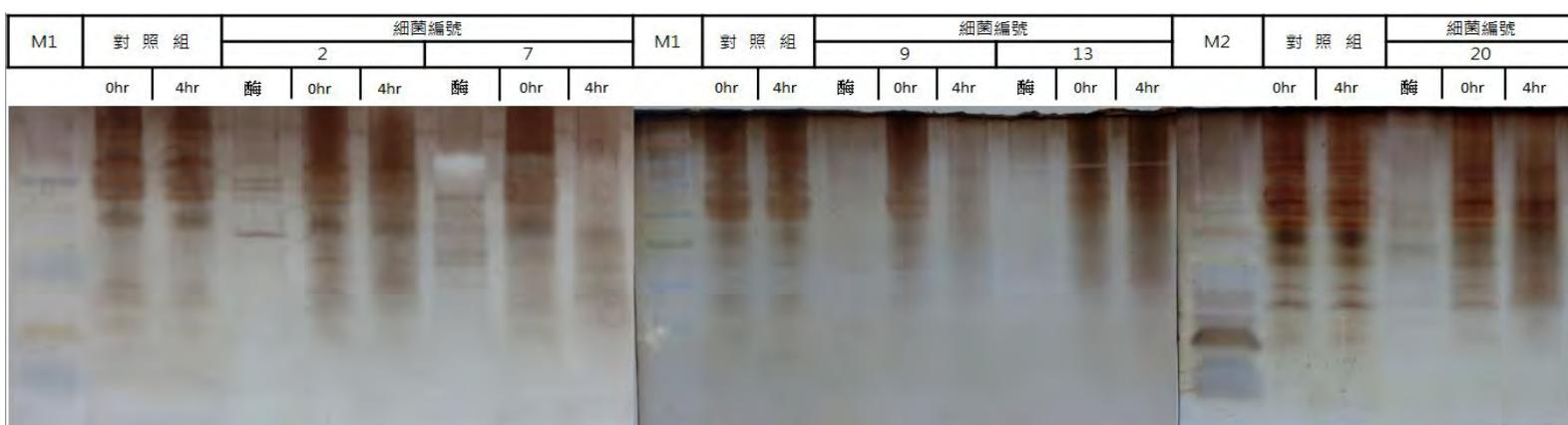


圖 16、銀染結果：M1、M2 為 marker；對照組為只加 gliadin 不含酶；2 號、7 號、9 號、13 號、20 號菌都有酶、0hr、4hr，依序為只加酵素、反應 0 小時、反應 4 小時

「酶」組用意避免本身為蛋白質的酶經染色後影響殘存量的判斷，而結果可以看到酶相較於整條 gliadin 顏色淺許多，所以我們認為影響觀察不大。由圖 16 明顯地看到 7 號、9 號從 0hr 到 4hr 的顏色變淺，代表 gliadin 被大量分解，2 號、13 號、20 號則看不出來。

$$\frac{|TP_x - 255|}{|TP_0 - 255|}$$

圖 17、分解殘存率換算公式  
(TP<sub>x</sub>：反應 x 小時)

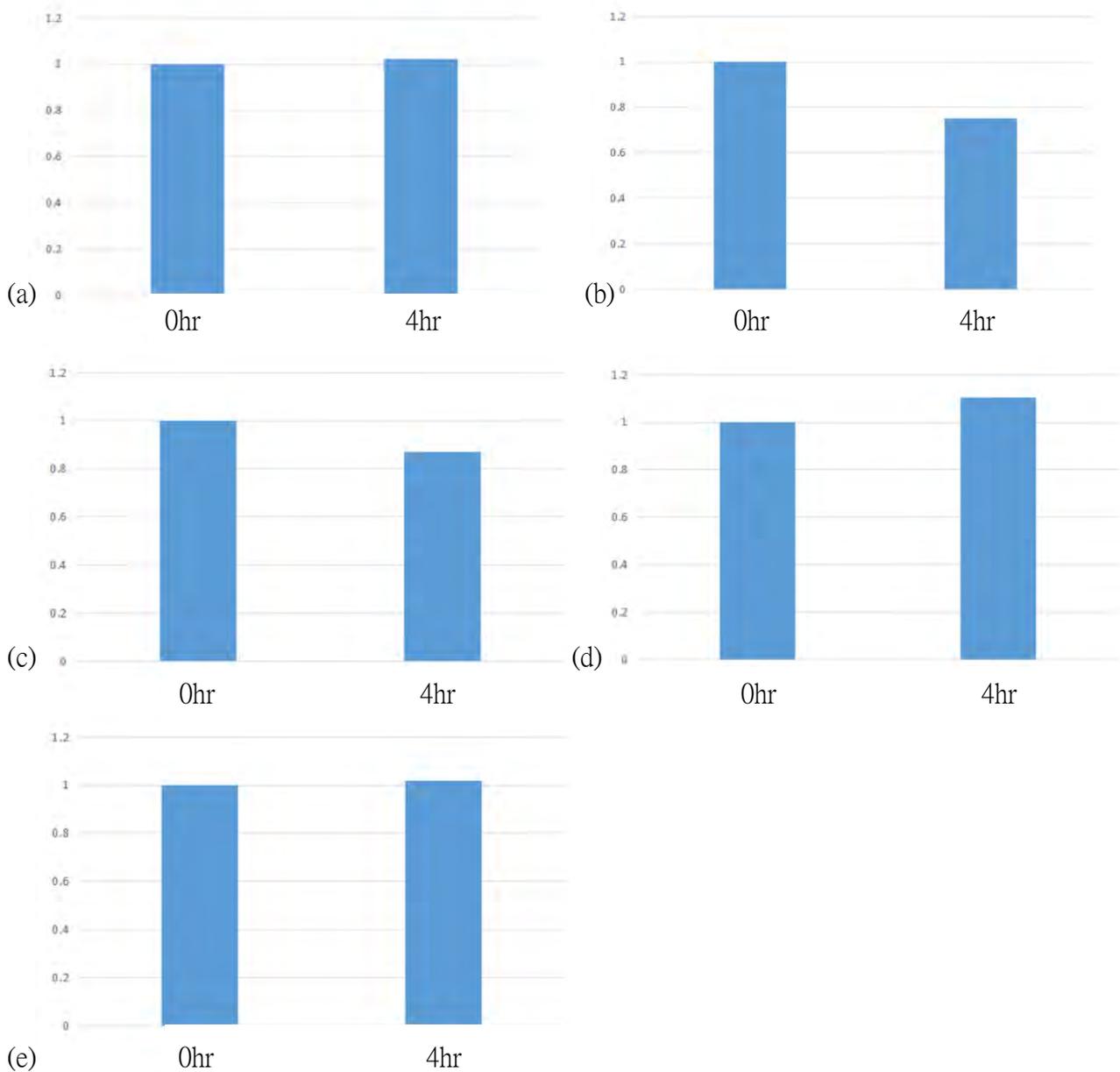


圖 18、 $\alpha$ -gliadin 分解殘存率表：橫坐標為反應 0 小時、反應 4 小時；縱座標為  $\alpha$ -gliadin 剩餘率  
 (a)、2 號 (b)、7 號 (c)、9 號 (d)、13 號 (e)、20 號

我們以 image J 測量  $\alpha$ -gliadin 的平均灰階值，並經由公式(圖 17)換算得  $\alpha$ -gliadin 的分解剩餘率以比較菌種的分解能力。

7 號、9 號在圖 18-(b)、圖 18-(c)可見其剩餘率下降，代表  $\alpha$ -gliadin 有被分解。但 2 號、13 號、20 號剩餘率竟上升，顯然不合理。因此我們決定以 zymogram，同時降低反應 pH 值至 2.5 再比較一次。

此外，由「酵素活性測試」實驗的圖 13-b 可見：20 號相較 2 號、13 號明帶已不明顯，所以便不再重做，直接捨棄。



圖 19、zymogram 結果

由圖 19 可知，pH 值降至 2.5 時，13 號的分解能力相較圖 13-b 變弱許多，不符合我們找菌的最終目的故刪除；2 號分解能力則大致相同，故予以保留。

在此階段，我們從 5 種菌篩至剩 3 種，分別為 2 號、7 號、9 號。

### 七、胃環境測試

比較篩得菌種與 gluten ease 於 pH3.5(食物入胃時胃之 pH 值)、4 小時內降解  $\alpha$ -gliadin 所得之  $\alpha$ -gliadin 剩餘率。

我們以 image J 測量  $\alpha$ -gliadin 的平均灰階值。並經由公式(圖 17)換算得  $\alpha$ -gliadin 的分解剩餘率比較 2 號、7 號、9 號菌與 gluten ease 的分解能力。

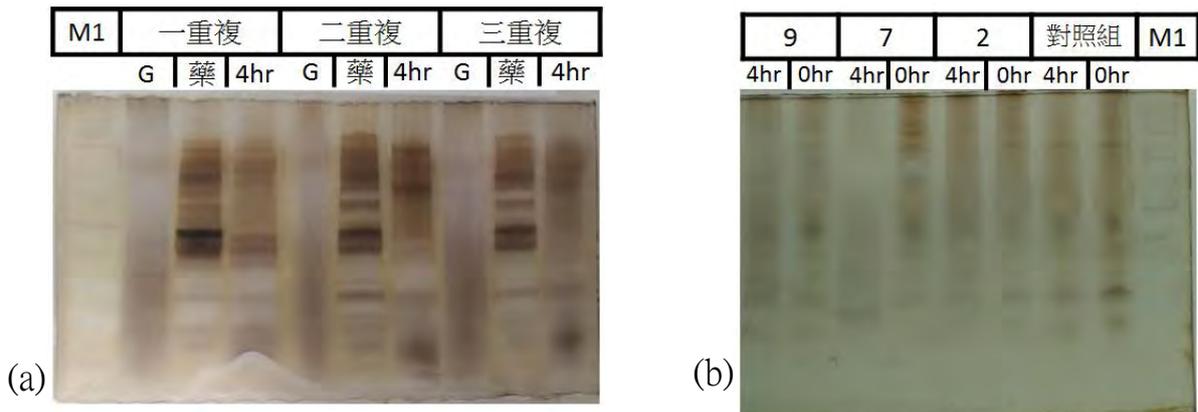


圖 20、銀染結果：M1 為 marker

(a)、gluten ease 組：G、藥、4hr，依序為只加 gliadin、只加 gluten ease、兩者混合反應 4 小時  
 (b)、2 號、7 號、9 號：0hr、4hr，依序為反應 0 小時、反應 4 小時

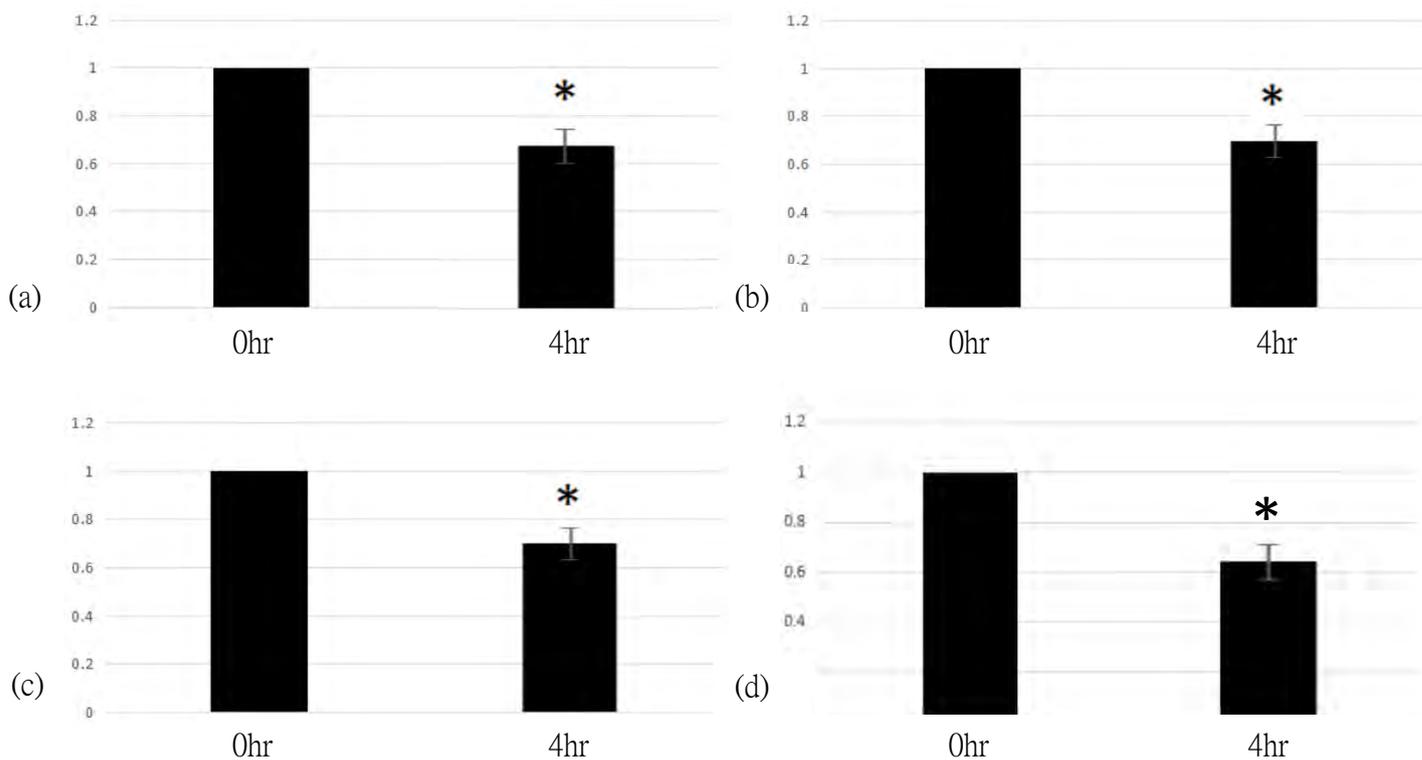


圖 21、 $\alpha$ -gliadin 分解殘存率表：橫坐標為反應 0 小時、反應 4 小時；縱座標為  $\alpha$ -gliadin 剩餘率  
\* 表示於 T-test 中 P 值小於 0.05

(a)、2 號 (b)、7 號 (c)、9 號 (d)、gluten ease

由圖 21 可見 2 號、7 號、9 號、gluten ease 的  $\alpha$ -gliadin 剩餘率經 T-test 分析均有顯著下降，分別為 76%、76%、73%、64%。故 2 號、7 號、9 號菌的酵素在 pH3.5 仍可分解  $\alpha$ -gliadin，且與 gluten ease 能力相差不遠。

## 陸、討論

本研究為了找尋能分解 gliadin 的菌種，先從各地取得許多菌種，再依序以各種不同實驗確認並比較菌株的分解能力來篩菌，最後得到三種可於胃 pH 值分解的菌，分別為 *Burkholderia sp.1*、*Dyellayeoj sp.1*、*Dyella sp.2*。

實驗一開始以四種來源嘗試取得目標菌種。至於自然生長的部分之所以沒找到細菌，推測為埋放時間過久導致 gliadin 已被細菌徹底分解，細菌無法得到新的 gliadin 而散去；又可能是受到自然因素如大雨沖刷、強風吹襲使得 gliadin 流失。

在酵素活性測試，由於電泳前已在上清液加入 SDS、並於低溫電泳來抑制酵素活性，但仍可看見 2 號在電泳時仍一邊移動一邊分解 gliadin，可知該酵素應非常強，能

忍受逆境，此為後續我們保留它繼續測試之原因。其餘酵素仍陸續送質譜儀定序中以找出名稱。

銀染前測實驗的意義為：因其後的實驗需用銀染以測定濃度，顧慮原本 CMM 培養液中作為氮源的 casein 若分解不完全，可能會影響結果深淺的測定，所以想嘗試使用非蛋白質的氮源替換 casein，測試細菌在不同氮源環境生長、分泌酶之分解能力是否改變。若差別不大，即可以其他氮源取代 casein 以避免染色時干擾。但結果發現若用其他氮源取代 casein，酶皆不能達到原本的分解效果，故未改變氮源，而是增長養菌時間由三天變七天，使 casein 被分解地更完全，減少干擾。

在銀染實驗時，因為 gliadin 在進入腸道才開始引起一系列過敏反應，所以最晚須在胃即被分解才有意義。食物停留在胃的時間至多 4 小時，故我們讓酵素分解 4 小時後觀察 gliadin 殘存情形，而也將反應環境定為胃含食物時的酸鹼值 pH4。我們圈選  $\alpha$ -gliadin 的位置測量其平均灰階值，計算出 7 號、9 號分解剩餘率 4 小時之值小於 1，代表有強大分解能力。

2 號雖在銀染皆不如 7 號、9 號有明顯顏色差異，但在酵素活性測試可見其明帶相較 7 號、9 號更明顯而透徹，猜測因酵素活性測試有加入  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  提供輔因子而銀染無，導致兩者的差異。

在最後於胃環境比較分解能力時，我們認為細菌酵素的  $\alpha$ -gliadin 分解殘存率偏高可能因為所加入的菌液上清液，其中所含蛋白質並非全為酵素，但用分光光度計測量濃度時並無法區別，造成酶實際濃度比測得的少。而 gluten ease 之所以沒有反應 0 小時之組其原因是即使我們先將純 gluten ease 高溫加熱期望消去活性，並添加 sample dye 希望停止反應，銀染的結果 gliadin 還是被分解了，只好分別銀染 gluten ease 與 gliadin。

## 柒、結論

### 一、研究結論

- (一) 本研究純化得三株降解  $\alpha$ -gliadin 能力佳的細菌，分別為 *Burkholderia sp.1*、*Dyellayeojsp.1*、*Dyella sp.2*。
- (二) 此三種菌在 pH2.5~4 之環境仍具分解  $\alpha$ -gliadin 能力。
- (三) 目前結果得知 2 號菌的酶包含胜肽酶 alpha、胜肽酶 beta。

## 二、未來展望

### (一)後續實驗

1. 縮小時間點探究 gliadin 降解詳細情況。
2. 將純化的酶與 gluten ease 比較分解能力。
3. 測試酵素分解  $\alpha$ -gliadin 內引起過敏的肽鏈。

### (二)應用與發展

1. 本酵素有潛力開發成治療麥麩過敏症的藥品，未來將持續深入探究其發展的可能性。
2. 未來將探討以其他原理研發不同的治療效果(如：製造可接上抗體的相對抗原、抑制 gliadin 的修飾作用等)。
3. 未來將再以同樣的概念和實驗步驟研究其他消化疾病。

## 捌、參考資料及其他

一、應用生物·第二章第二節-酵素在食品上的應用·康熙文化

二、選修生物(上)·第六章-動物的消化與吸收·康熙文化

三、選修生物(下)·第十章-人體的防禦·康熙文化

四、Schoenstadt(2017)Celiac Disease Statistics : <http://celiac-disease.emedtv.com/m/celiac-disease/celiac-disease-statistics.html>

五、Helene Arentz-Hansen, Roman Körner, Øyvind Molberg, Hanne Quarsten, Willemijn Vader, Yvonne M.C. Kooy, Knut E.A. Lundin, Frits Koning, Peter Roepstorff, Ludvig M. Sollid, Stephen N. McAdam(2000, February 21)The Intestinal T Cell Response to  $\alpha$ -Gliadin in Adult Celiac Disease Is Focused on a Single Deamidated Glutamine Targeted by Tissue Transglutaminase, JEM, vol.191, no. 4:603-612 取自 <http://jem.rupress.org/content/191/4/603>

六、Nicole Puglise(2016)More Americans are eating gluten-free despite not having celiac disease : <https://www.theguardian.com/society/2016/sep/06/gluten-free-eating-celiac-disease-marketing-trend-diet>

七、Haiyan(2011)粘質沙雷氏菌 : [http://www.zwbk.org/zh-tw/Lemma\\_Show/196198.aspx](http://www.zwbk.org/zh-tw/Lemma_Show/196198.aspx)

八、F. Maurano, R. A. Siciliano, B. De Giulio, D. Luongo, M. F. Mazzeo, R. Troncone, S. Auricchio, M. Rossi. Intranasal (2001). Administration of One Alpha Gliadin Can Downregulate the Immune Response to Whole Gliadin in Mice. Scandinavian Journal of Immunology, Volume 53, Issue 3:290 - 295, 取自 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-3083.2001.00869.x/full>

- 九、 Raffaella Di Cagno, Maria De Angelis, Paola Lavermicocca, Massimo De Vincenzi, Claudio Giovannini, Michele Faccia, Marco Gobetti,(2002),Proteolysis by Sourdough Lactic Acid Bacteria: Effects on Wheat Flour Protein Fractions and Gliadin Peptides Involved in Human Cereal Intolerance,Applied and Environmental Microbiology,vol. 68,no. 2:623-633,取自 <http://aem.asm.org/content/68/2/623.short>
- 十、 Ivana Caputo、Maria Vittoria Barone、Marilena Lepretti、Stefania Martucciello、Ivan Nista Riccardo Troncone、Salvatore Auricchio、Daniele Sblattero、Carla Esposito(September 2010)Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease Volume 1802, Issue 9:717-727
- 十一、 Martial Rey、Menglin Yang、Linda Lee、Ye Zhang、Joey G. Sheff、Christoph W. Sensen、Hynek Mrazek、Petr Halada、Petr Man、Justin L McCarville、Elena F. Verdu、David C. Schriemera(2016, Aug 2)Addressing proteolytic efficiency in enzymatic degradation therapy for celiac disease nature scientific reports PMID: PMC4969619

## 【評語】 052014

麥麩，是一種普遍存在於大部分麵粉製品的蛋白質。麥麩過敏症則是因人體對麥麩不正常的免疫反應所致。麥麩過敏症在亞州尚未被積極研究，然而卻是西方人常見的一種疾病，在美國的盛行率約 0.1%(Schoenstadt, 2017)。其致病機制為：麥麩進入消化道時會水解成麥醇溶蛋白(gliadin)和穀蛋白(glutenin)，而 gliadin 裡一種特殊蛋白  $\alpha$ -gliadin 被體內酵素分解成短肽鏈、經過修飾並與其他蛋白質結合，此時患者體內特有的抗體會辨識出此物質，而產生一連串過敏反應

1. 麥麩 (Gluten) 存在於麥類中的蛋白質，主要是由 Glutenin 與 Gliadin 兩類所構成。此次的實驗尋找細菌能夠只探討分解  $\alpha$ -gliadin 缺乏了對 Glutenin 分解的研究。
2. 只有 7 號跟 9 號稍微能稍微分解 gliadin，但是這分解的程度是不是足夠來治療疾病有待商榷。
3. 實驗可以再稍微深入探討，是何種酵素？這種酵素是不是存在其他生物體內？
4. 可以分解 gliadin 的酵素已經有人報導，宜參考此文獻  
Prolidase is a critical enzyme for complete gliadin digestion in *Tenebrio molitor* larvae Arch Insect Biochem Physiol. 2017 Aug;95(4).

5. 在實驗設計上，取得數據的方法可以更加嚴謹，實驗次數也可增加，以此提高實驗的準確性。
6. 此研究在文獻的探討上較欠缺，且對於如何鎖定所選之菌種的邏輯與思考陳述上較不足。

# 摘要

麥麩過敏症的過敏主因為小麥內的麥醇溶蛋白(gliadin)。多數患者對 $\alpha$ -gliadin過敏。此症仍無法被治癒，目前主要以無麥麩飲食應對。我們從自然界找到分解gliadin的細菌，並測試其分解能力。首先，我們取得若干菌種，利用gliadin培養基初步確認是否分解gliadin，得到二十種細菌，並以PCR及核酸定序找出菌的名稱。再使用gliadin培養基與zymogram比較各細菌酵素分解gliadin的能力，篩至五種菌，又以質譜儀找出酶的名稱。再以銀染實驗比較目標菌種之酵素分解 $\alpha$ -gliadin的效果，篩至三種菌。最後於胃中酸鹼值環境定量測試三種菌酵素及緩解麥麩過敏症之成藥(gluten ease)分解 $\alpha$ -gliadin能力。本研究最終得到三株於胃中酸鹼值仍能降解 $\alpha$ -gliadin的細菌，分別為：Burkholderia sp.1、Dyella sp.1、Dyella sp.2。未來有機會將酵素開發成治療麥麩過敏症的藥品。

## 研究動機

麥麩過敏症是人體對麥麩**不正常的免疫反應**所致。此疾病目前只能以無麥麩飲食應對，而相關藥物只能減輕誤食少量麥麩時產生的過敏反應。因此我們想從自然界的細菌中**找到可分解 $\alpha$ -gliadin的酵素**，並**比較酵素分解 $\alpha$ -gliadin的成效**。期許未來將研究結果開發成藥物，幫助為此病所苦的人。

## 研究目的

- 一、找出能分解麥麩的細菌
- 二、找出該菌的酶名稱
- 三、比較酶分解能力

## 研究過程



蒐集菌種 ➔ 細菌定序 ➔ 篩選菌種 ➔ 定量測試前測——不同氮源比較 ➔ 胃環境測試

## 研究結果

### 一、蒐集菌種

自然生長沒有蒐集到細菌，食蟲植物、麵粉為食的昆蟲、其他的部分皆有得到若干菌株(圖一)。共蒐集到20株初步認定有分解gliadin的菌。PCR定序結果見表一。

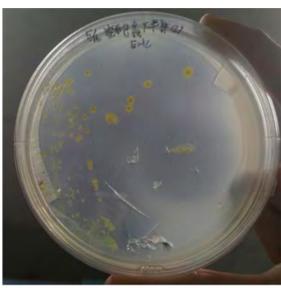
表一、PCR定序結果



(a)

(b)

(c)



(d)

圖一、將採集的樣本塗在gliadin培養基上，若培養基形成菌落與透明圈代表可能分解gliadin，便蒐集該菌株。  
(a)、自然生長  
(b)、食蟲植物(彩虹草)  
(c)、麵粉為食的昆蟲(菸甲蟲)  
(d)、其他(石礫土壤)

編號	來源	菌種	備註
1	蜂巢花粉	真菌	
2	彩虹草	<i>Burkholderia sp.1</i>	
3	泡麵 I	<i>Pseudomonas sp.1</i>	菌落成黃色
4	泡麵 II	<i>Pseudomonas sp.2</i>	菌落成白色
5	麵包蟲 I	<i>Pseudomonas sp.3</i>	取麵包蟲下半部
6	麵包蟲 II	<i>Pseudomonas sp.4</i>	取麵包蟲內臟
7	石礫土壤	<i>Dyella sp.1</i>	
8	竹林土壤	<i>Serratia sp.1</i>	
9	餵水	<i>Dyella sp.2</i>	
10	鵝舍土壤	<i>Pseudomonas sp.5</i>	
11	雞舍土壤	<i>Pseudomonas sp.6</i>	
12	雞毛	真菌	
13	鴨舍土壤 I	<i>Serratia sp.2</i>	菌落成粉色
14	鴨舍土壤 II	<i>Aeromonas sp.1</i>	菌落具光澤
15	菸甲蟲 I	<i>Serratia sp.3</i>	透明圈大
16	菸甲蟲 II	<i>Serratia sp.4</i>	透明圈較小
17	仁義潭土壤 I	<i>Serratia sp.5</i>	菌落成白色
18	仁義潭土壤 II	<i>Serratia sp.6</i>	菌落成紅色
19	雞舍土壤 I	<i>Bacillus sp.1</i>	LB培養基成白色
20	雞舍土壤 II	<i>Pseudomonas sp.7</i>	LB培養基成綠色

## 二、篩選菌種

### (一)比較於培養基中分解能力

根據定序結果，單一菌種皆保留。若有重複則比較透明圈直徑大小篩至八種菌(圖二)。

### (二)酵素活性測試(zymogram)

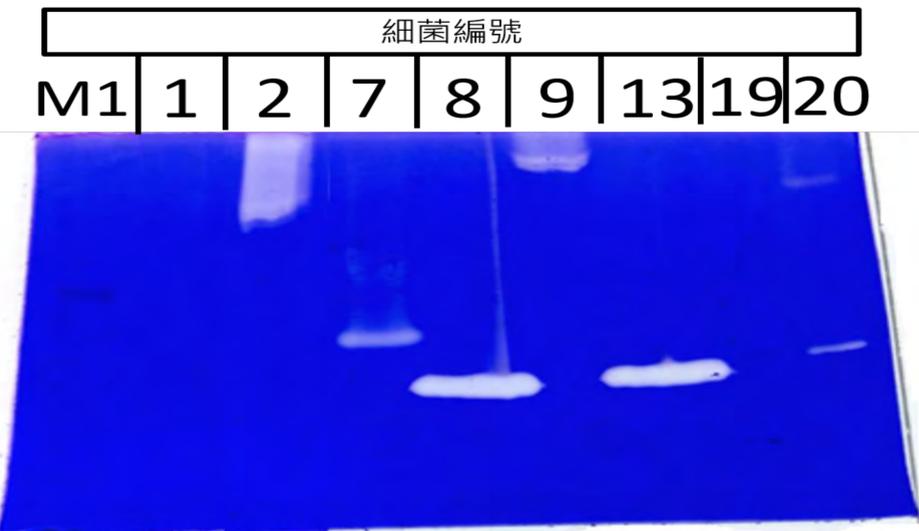
此階段篩至五種菌(圖三)。且割下透明帶並利用質譜儀找出酶名稱。目前結果已知二號菌包含胜肽酶alpha、胜肽酶beta。

### (三)不同氮源測試

考慮培養液的蛋白質氮源可能影響染色後觀察，以非蛋白質氮源培養，並觀察其分解gliadin的差異。結果仍維持使用蛋白質氮源(圖四)。



圖二、比較於培養基中分解能力於gliadin培養基置入沾有菌液的濾紙，觀察透明圈直徑大小

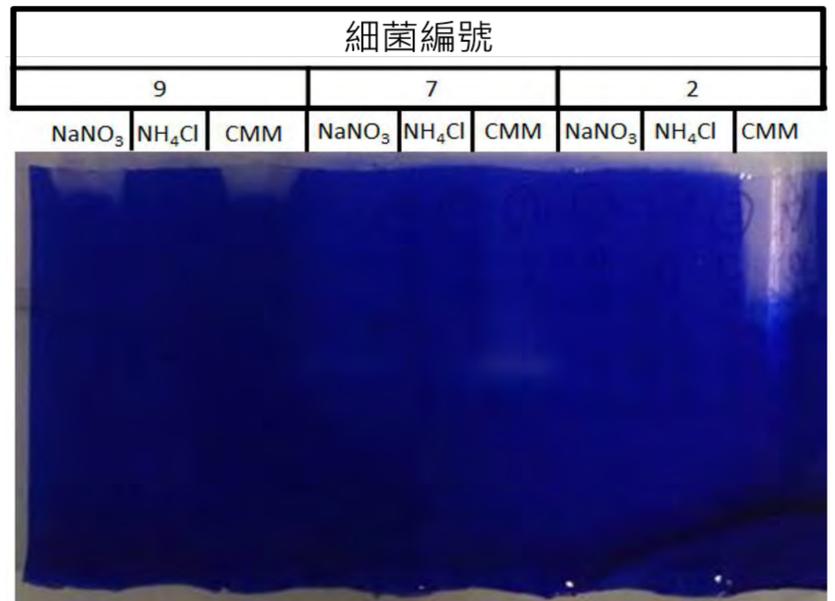


圖三、酵素活性測試(zymogram)

染劑只染膠體中的gliadin，故明帶代表該處gliadin被菌液酵素分解

### (四)比較於SDS-page分解能力

測量α-gliadin染色後的深淺度(圖六)並以自訂公式(圖五)換算成α-gliadin分解殘存百分率(圖七)。結果篩至三種菌。

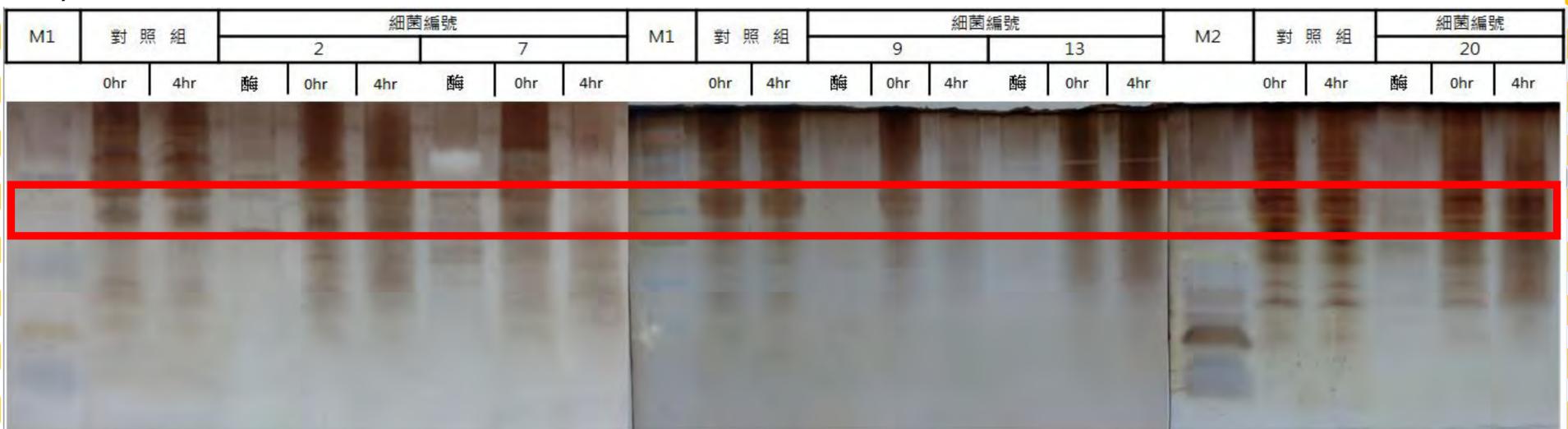


圖四、不同氮源測試

染劑只染膠體中的gliadin，故明帶代表該處gliadin被菌液酵素分解。NaNO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、CMM分別代表所加氮源

$$|TPX - 255| / |TP0 - 255|$$

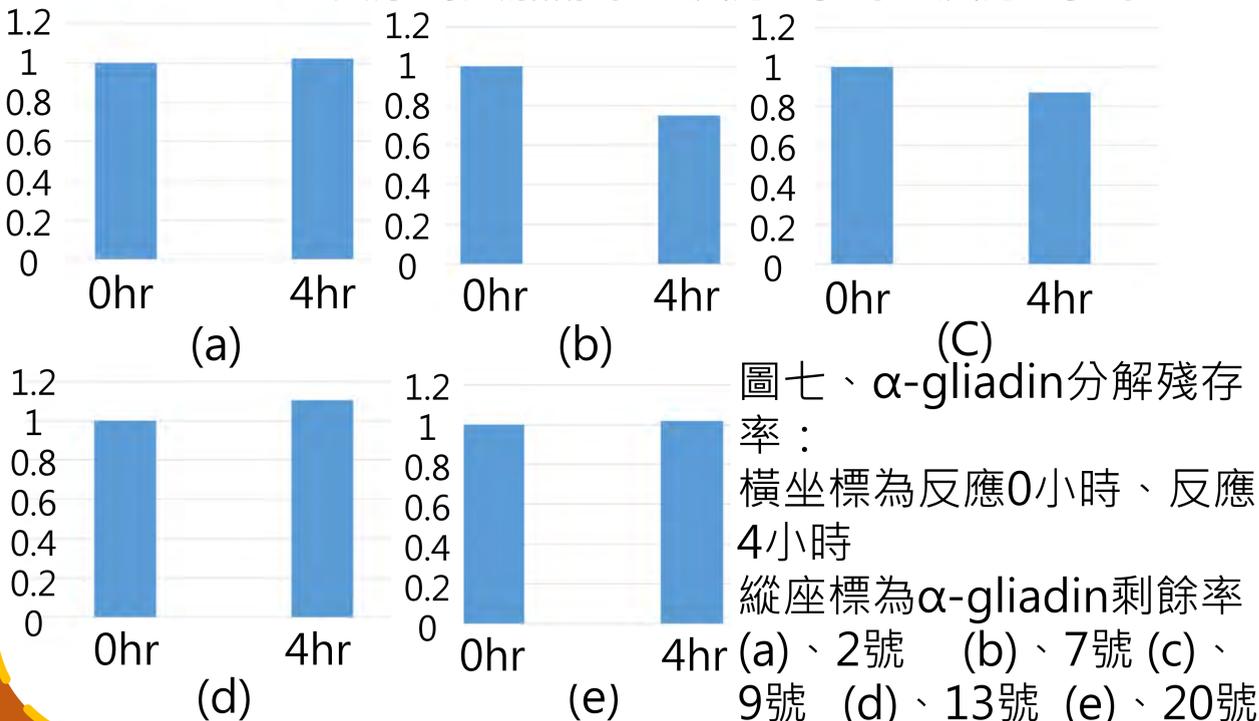
圖五、分解殘存率換算公式  
TPX代表X小時紅框內條帶深度



圖六、比較於SDS-page分解能力染色結果

紅框為α-gliadin位置

M1、M2為marker；對照組為只加gliadin不含酶；2號、7號、9號、13號、20號菌都有酶、0hr、4hr，依序為只加酵素、反應0小時、反應4小時



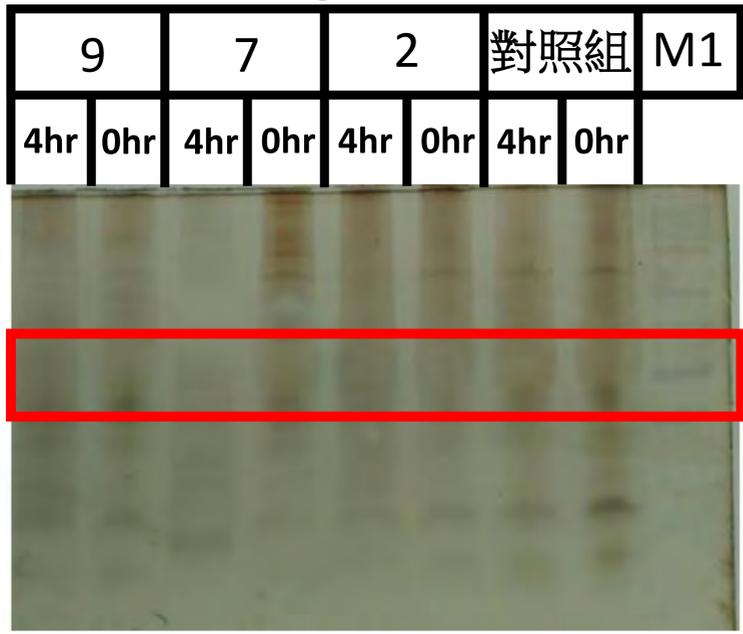
圖七、α-gliadin分解殘存率：  
橫坐標為反應0小時、反應4小時  
縱座標為α-gliadin剩餘率  
(a)、2號 (b)、7號 (c)、9號 (d)、13號 (e)、20號



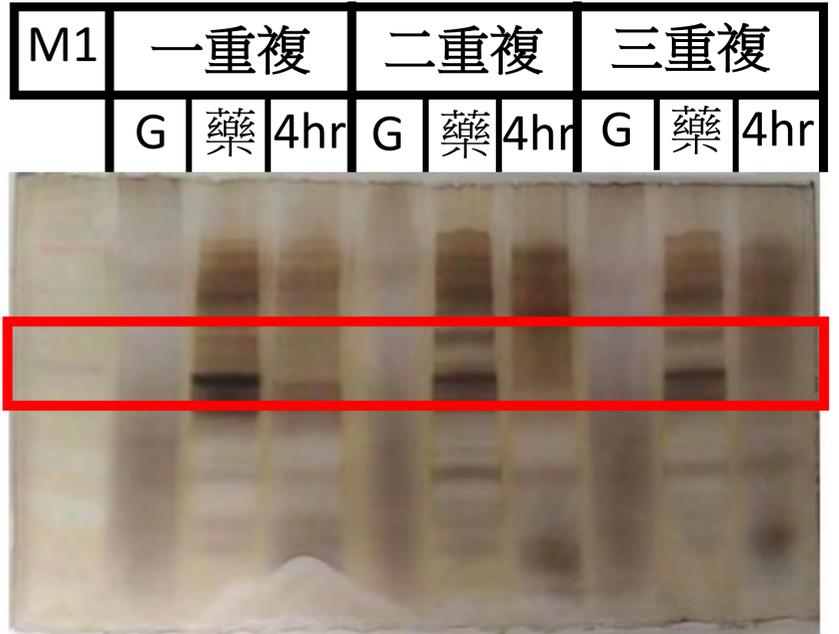
圖八、酵素活性測試(zymogram) (pH2.5)  
染劑只染膠體中的gliadin，故明帶代表該處gliadin被菌液酵素分解

#### 四、胃環境測試

反應環境酸鹼值降至pH3.5。測量 $\alpha$ -gliadin染色後的深淺度(圖九)並以自訂公式(圖五)換算成 $\alpha$ -gliadin分解殘存百分率(圖十)。



(a)

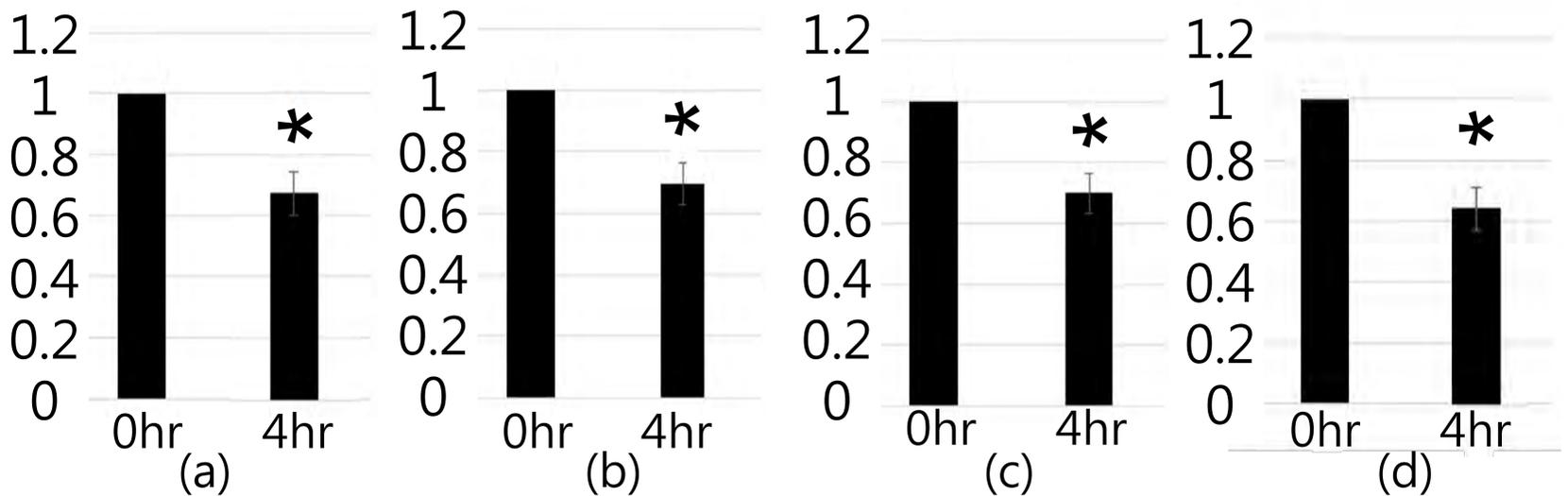


(b)

圖九、胃環境測試染色結果：M1為marker 紅框為 $\alpha$ -gliadin位置

(a)、2號、7號、9號：0hr、4hr，依序為反應0小時、反應4小時

(b)、gluten ease組：G、藥、4hr，依序為只加gliadin、只加gluten ease、兩者混合反應4小時



圖十、 $\alpha$ -gliadin分解殘存率表：

橫坐標為反應0小時、反應4小時；縱坐標為 $\alpha$ -gliadin剩餘率

\* 表示於T-test中P值小於0.05

(a)、2號 (b)、7號 (c)、9號 (d)、gluten ease

## 結論與討論

- 一、本研究純化得**三株降解 $\alpha$ -gliadin能力佳的細菌**，分別為*Burkholderia sp.1*、*Dyella sp.1*、*Dyella sp.2*。
- 二、此三種菌在pH2.5~4之環境仍具分解 $\alpha$ -gliadin能力。
- 三、自然生長未獲得細菌，推測為**麥麩堆放時間過久**導致細菌徹底分解麥麩後即散去而失去優化意義，或是受到自然因素使麥麩流失。
- 四、若用非蛋白氮源養菌，酶皆不能達到原本的分解效果，故**增長養菌時間**由三天變七天，減少培養液裡殘留的蛋白質氮源染色時的干擾。
- 五、胃環境測試中，gluten ease之所以沒有反應0小時之組，其原因是：即使我們先將純gluten ease高溫加熱期望消去活性，並添加sample dye希望停止反應，銀染的結果gliadin還是被分解了，只好分別銀染gluten ease與gliadin。
- 六、胃環境測試中，細菌酵素的 $\alpha$ -gliadin分解殘存率偏高可能因為所加入的菌液上清液所含蛋白質並非全為酵素，但測量濃度時並無法區別，造成**酶實際濃度比測得的少**。

## 未來展望

- 一、應用與發展
- (一)本酵素有潛力**開發成治療麥麩過敏症的藥品**，未來將持續深入探究其發展的可能性。
- (二)未來將探討以其他原理研發不同的治療效果(如：製造可接上抗體的相對抗原、抑制gliadin的修飾作用等)。
- (三)未來將再以同樣的概念和實驗步驟研究其他消化疾病。

## 參考資料

- 一 應用生物-第二章第二節-酵素在食品上的應用-康熙文化
- 二 選修生物(上)-第六章-動物的消化與吸收-康熙文化
- 三 選修生物(下)-第十章-人體的防禦-康熙文化
- 四 Schoenstadt(2017)Celiac Disease Statistics : <http://celiac-disease.emedtv.com/m/celiac-disease/celiac-disease-statistics.html>
- 五 Helene Arentz-Hansen, Roman Körner, Øyvind Molberg, Hanne Quarsten, Willemijn Vader, Yvonne M.C. Kooy, Knut E.A. Lundin, Frits Koning, Peter Roepstorff, Ludvig M. Sollid, Stephen N. McAdam(2000, February 21)The Intestinal T Cell Response to  $\alpha$ -Gliadin in Adult Celiac Disease Is Focused on a Single Deamidated Glutamine Targeted by Tissue Transglutaminase, JEM, vol.191, no. 4:603-612 取自 <http://jem.rupress.org/content/191/4/603>
- 六 Nicole Puglise(2016)More Americans are eating gluten-free despite not having celiac disease : <https://www.theguardian.com/society/2016/sep/06/gluten-free-eating-celiac-disease-marketing-trend-diet>
- 七 Haiyan(2011)粘質沙雷氏菌 : [http://www.zwbk.org/zh-tw/Lemma\\_Show/196198.aspx](http://www.zwbk.org/zh-tw/Lemma_Show/196198.aspx)
- 八 F. Maurano, R. A. Siciliano, B. De Giulio, D. Luongo, M. F. Mazzeo, R. Troncone, S. Auricchio, M. Rossi, Intransal(2001).Administration of One Alpha Gliadin Can Downregulate the Immune Response to Whole Gliadin in Mice.Scandinavian Journal of Immunology, Volume 53, Issue 3:290-295, 取自 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-3083.2001.00869.x/full>
- 九 Raffaella Di Cagno, Maria De Angelis, Paola Lavermicocca, Massimo De Vincenzi, Claudio Giovannini, Michele Faccia, Marco Gobetti,(2002).Proteolysis by Sourdough Lactic Acid Bacteria: Effects on Wheat Flour Protein Fractions and Gliadin Peptides Involved in Human Cereal Intolerance, Applied and Environmental Microbiology, vol. 68, no. 2:623-633, 取自 <http://aem.asm.org/content/68/2/623.short>
- 十 Ivana Caputo · Maria Vittoria Barone · Marilena Lepretti · Stefania Martucciello · Ivan Nista Riccardo Troncone · Salvatore Auricchio · Daniele Sblattero · Carla Esposito (September 2010) Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease Volume 1802, Issue 9:717-727
- 十一 Martial Rey · Menglin Yang · Linda Lee · Ye Zhang · Joey G. Sheff · Christoph W. Sensen · Hynek Mrazek · Petr Halada · Petr Man · Justin L McCarville · Elena F. Verdu · David C. Schriemer (2016, Aug 2) Addressing proteolytic efficiency in enzymatic degradation therapy for celiac disease nature scientific reports PMCID: PMC4969619