

乳铁蛋白活性多肽的抑菌性能

许时婴, 卢蓉蓉

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214036)

摘要: 概述了乳铁蛋白活性多肽的结构、制备方法、抑菌谱、抑菌机理及抑菌活性的影响因素。

关键词: 乳铁蛋白; 活性多肽; 抑菌活性

中图分类号: Q513.2

文献标识码: A

Antibacterial Property of Lactoferricin

XU Shi-ying, LU Rong-rong

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The structure, preparation, antibacterial spectrum, antibacterial mechanism of lactoferricin and influenced factors of its antibacterial activity were reviewed in this paper.

Key words: lactoferrin; lactoferricin; antibacterial activity

乳铁蛋白(Lactoferrin, 以下简称为 LF)是一种相对分子质量约为 80 000 的铁结合性糖蛋白。LF 作为一种与生俱来的抗体广泛存在于动物体的分泌物如乳汁、体液、泪液和唾液中^[1]。

在哺乳动物的初乳(母体分娩后一周内分泌的乳汁)中, 它的含量较多。牛初乳中的乳铁蛋白(简称为 bLF)质量浓度较高(平均为 1 g/L), 人乳中的乳铁蛋白(简称为 hLF)质量浓度约是 bLF 的 10 倍。所以国外已借助 hLF 的基因, 采用转基因技术大幅度增加牛乳中 LF 的含量。

LF 具有独特的生理调节代谢功能, 能增强铁的传递和利于人体吸收, 具有广谱抗菌性、抗病毒作用、免疫作用, 可作为天然的抗氧化剂, 能消炎, 并能作为生长因子促进肠道菌群的平衡^[2]。

LF 最重要的生理功能就是广谱抑菌性, 被认为是存在于初乳和牛乳中的宿主防御系统中的活性成分。近年来, 人们对 LF 的临床研究, 已充分证

实了这一点。随着研究的深入, 人们又发现了乳铁蛋白的活性多肽, 它的抑菌效果是 LF 的 400 倍。由此, 研究者认为, LF 是抑菌成分的前体物质。

1 乳铁蛋白活性多肽的结构

Horoaki 等^[3]为了开发适用于 LF 的实用性巴氏杀菌方法, 研究了酸性 pH 条件下 LF 的热稳定性。他发现 LF 在 pH 2.0 或 3.0 条件下, 经历 120 °C 杀菌 5 min 后, 发生了明显的酸降解, 但抑菌活性却比未经热处理的 LF 强。由此推断, LF 在酸性条件下经热处理产生了一些耐热的抑菌活性强于 LF 的多肽。

Tomita 等^[4]研究了 bLF 经蛋白酶降解后的活性多肽的抑菌性能。结果表明, 经猪胰蛋白酶水解得到的小分子多肽具有广谱的抑菌活性, 可以显著抑制一些革兰氏阳性菌(G⁺)和革兰氏阴性菌(G⁻)

的生长,甚至包括一些 LF 不起作用的菌株.水解多肽的抑菌活性至少是 LF 的 8 倍.向多肽中添加铁,抑菌活性不受影响,这一点与 LF 截然不同.

Bellamy^[5]从 LF 分子的 N 端进行分离,分别得到了人乳和牛乳乳铁蛋白的活性多肽,并分别命名为 lactoferricin H (以下简称为 Lfcin H) 和 lactoferricin B(以下简称为 Lfcin B).

Lfcin B 的相对分子质量为 3 100 左右,由 25 个氨基酸残基组成,氨基酸序列为:

Phe-Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro-Ser-Ile-Thr-Cys-Val-Arg-Arg-Ala-Phe

Lfcin H 包含许多疏水键和带正电的残基,呈现两性性质.其中的两个半胱氨酸通过二硫键相连接,此二硫键在 LF 中也存在,但对抑菌活性无影响. Lfcin H 由 47 个氨基酸残基组成,其中包含了与 Lfcin B 一致的区域组成.这一区域是具有抑菌特性的 LF 的特征结构^[1,5].

Lfcin B 的抑菌效果比 Lfcin H 强. Hwang 等^[6]研究了 Lfcin B 溶液的三维构象, NMR 分析表明, Lfcin B 的空间构象为扭曲的反向平行的 β -折叠状.对照 LF 的 X 衍射分析, LF 的结构为 α -螺旋结构.由此推测,由 α -螺旋结构向 β -折叠状构象的转换,可能是导致抑菌性能增强的重要原因,因为后者的构象更易于贴近细菌的表面.

2 乳铁蛋白活性多肽的制备方法

牛乳铁蛋白(50 g/L)的水溶液,用 1 mol/L 的 HCl 调整 pH 至 3.0,加入 3% 胃蛋白酶,于 37 ℃ 下水解 4 h. 80 ℃ 加热 15 min 以终止反应,加入 1 mol/L 的 NaOH 调整 pH 至 7.0.非可溶性的多肽经 15 000 g 离心 30 min 获得.水解物用 TSK-GEL 120T 柱(D 6.0 mm $\times$ 150 mm)分离,再经 COS-MOSIL 5CN-R 柱(D 4.6 mm $\times$ 150 mm)纯化,冷冻干燥.所得的活性多肽的纯度大于 95%. 详见文献^[1,4,5].

3 乳铁蛋白活性多肽的抑菌谱

Bellamy 等^[5]研究了 28 种菌株对 Lfcin B 抑菌性的敏感性.所选择的待测菌株代表了不同的种类,包括了 G^+ 和 G^- ,杆菌和球菌,专性需氧菌、兼性厌氧菌和专性厌氧菌.测定了在蛋白胨基础培养基(细菌蛋白胨 10 g/L)和 PYG 培养基(细菌蛋白

胨 10 g/L ;酵母浸膏 0.5 g/L ;葡萄糖 10 g/L)上 Lfcin B 的有效抑菌质量浓度.结果表明,随菌株和培养基的变化,有效抑菌质量浓度范围为 0.6 ~ 45 $\mu\text{g/mL}$. 并发现, G^+ 对 Lfcin B 比 G^- 更为敏感.表 1 为不同菌株对 Lfcin B 的敏感性^[1,5].

表 1 Lfcin B 对不同菌株的最小抑制浓度
Tab. 1 Susceptibility of various bacteria to inhibition by Lfcin B

菌株	MIC/($\mu\text{g/mL}$) ¹⁾	
	蛋白胨培养基	PYG 培养基
革兰氏阴性菌(G^-)		
<i>Escherichia coli</i> O111	6	12
<i>coli</i> IID-861	6	9
<i>Klebstella pneumoniae</i> JCM-1662T	9	12
<i>Salmonella enteritidis</i> IID-604	12	18
<i>Proteus vulgaris</i> JCM-1668T	12	45
<i>Yersinia enterocolitica</i> IID-981	6	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MMI-603	12	24
<i>aeruginosa</i> IFO-3446	9	24
<i>aeruginosa</i> IFO-3448	9	45
<i>aeruginosa</i> IFO-3452	6	30
<i>fluorescens</i> IFO-14160	> 60	> 60
革兰氏阳性菌(G^+)		
<i>Staphylococcus aureus</i> JCM-2413	6	18
<i>aureus</i> JCM-2179	3	6
<i>aureus</i> JCM-2151	3	6
<i>epidermidis</i> JCM-2414T	3	6
<i>haemolyticus</i> JCM-2416T	0.6	1
<i>hominus</i> JCM-2419T	2	3
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC-E19433	> 60	> 60
<i>Streptococcus mutans</i> JCM-5705T	2	6
<i>mutans</i> JCM-5175	NG ²⁾	6
<i>mutans</i> JCM-5176	NG	3
<i>thermophilus</i> ATCC-19258	NG	3
<i>lactis</i> ATCC-19435	NG	3
<i>bovis</i> JCM-5672	3	6
<i>cremoris</i> ATCC-9265	NG	3
<i>Lactobacillus casei</i> MMI-114	NG	12
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i> JCM-1306	0.3	0.3
<i>renale</i> JCM-1322	0.6	1
<i>diphtheriae</i> JCM-1310	6	18

续表 1

菌株	MIC/($\mu\text{g/mL}$)	
	蛋白胨培养基	PYG培养基
<i>Listeria</i>		
<i>monocytogenes</i> JCM-7673	0.3	1
<i>monocytogenes</i> JCM-7674	0.6	3
<i>Bacillus</i>		
<i>subtilis</i> ATCC-6633	0.6	2
<i>natto</i> IFO-3009	1	2
<i>circulans</i> JCM-2504T	0.3	0.6
<i>cereus</i> MMI-272	9	9
<i>Clostridium</i>		
<i>perfringens</i> ATCC-6013	12	24
<i>paraputrificum</i> MMI-25	NG	3

1) MIC 最小抑制浓度；2) NG 在此培养基上不生长

Lfcin 会影响婴儿出生后快速建立起来的肠内菌群平衡体系的组成。众所周知,双歧杆菌对维持婴儿体内健康的微环境是非常重要的。当 Lfcin 存在时,绝大多数双歧杆菌的生长都不会受影响,然而,Lfcin 对一些重要的会引发胃肠疾病的微生物,如大肠杆菌、李斯特菌等,会有致死的影响。

4 乳铁蛋白活性多肽的抑菌机理

虽然 LF 和 Lfcin 的抑菌性已广为人知,但抑菌机理尚不很明确。目前,最新的认识是:LF 和 Lfcin 的抑菌性是直接性的‘铁剥夺’和间接性的‘膜渗透’两种机制的联合作用。

4.1 “铁剥夺”机制

LF 是一种铁结合性的糖蛋白,它可以与病原性微生物竞争性地结合铁离子,造成微生物生长的铁缺乏环境,使病原性微生物失去赖以生存的铁离子^[7,8],从而导致病原微生物的死亡。

抑菌活性取决于铁离子的饱和程度。饱和程度越高,抑菌活性就越弱。当 LF 中的铁完全饱和,抑菌活性就会丧失。

4.2 “膜渗透”机制

大量的研究结果^[5,9,12]表明,LF 和 Lfcin 的抑菌机制,不仅仅是简单的营养铁的剥夺,远比‘铁剥夺’要复杂得多。

带正电荷的 Lfcin 与带负电荷的磷脂和脂多糖有很强的亲和性。它们能与细胞膜结合在一起,具有亲膜活性,从而增强了细胞膜的通透性。这种作用,与 *Bacillus polymyxa* 产生的具有抑菌活性的多粘菌素 B 的亲膜特性很相似^[10]。Lfcin 对微生物的致死作用,体现为脂多糖的释放,细胞质膜生理功

能的彻底破坏。

G⁻细菌的外膜对于 Lfcin 直接进入细胞质膜起着一种屏障作用。脂多糖的结构会影响 G⁻细菌对 Lfcin 的敏感性,当脂多糖的链段缩短时,Lfcin 的致死浓度也随之下降^[11]。同样,不同菌属的 G⁻细菌对 Lfcin 敏感性的差异,也反应了外膜中脂多糖的结构和数量的差异。

G⁺与 G⁻相比,细胞质鞘的数量不同,存在位置也不同(不存在于外膜之中)。由于细胞壁中负电荷成分(如磷酸脂质体)的存在,会和带正电荷的 Lfcin 结合,从而阻断了 Lfcin 进入细胞质膜中的致死靶位,这些成分的结构和数量的不同,造成了 G⁺细菌对 Lfcin 敏感性的差异。中和细胞表面的负电荷,会降低具有亲膜活性的 Lfcin 与致死靶位的亲和性。

人们曾发现,当存在 HEPES、磷酸盐、柠檬酸盐、草酸盐时,缺铁型 LF (apolactoferrin) 的抑菌活性就会丧失;类似的,当存在阴离子,如 HEPES、PIPES、磷酸、柠檬酸或琥珀酸时,Lfcin 的抑菌效果同样也会丧失。两者的一致性说明,在 LF、Lfcin 与细胞表面的致死靶位的结合中,离子性的反应起着至关重要的作用。

5 乳铁蛋白活性多肽抑菌效果的影响因素

5.1 培养基质

培养基中的碳水化合物或蛋白质的种类对 Lfcin B 的抑菌效果影响不大^[5]。研究表明,葡萄糖、半乳糖、果糖、甘露糖、木糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、淀粉、果胶以及牛血清白蛋白(BSA),在 0 ~ 10 mg/mL 的质量浓度范围内,*E. coli* O111 的 MIC 均为 6 $\mu\text{g/mL}$,可见它们对 Lfcin B 的抑菌效果无显著影响。

5.2 离子强度

高浓度的盐类会增强疏水反应,从而促进某些抑菌肽的高分子聚合反应。当 NaCl 或 KCl 的浓度为 25 ~ 100 mmol/L, MgCl₂ 或 CaCl₂ 的浓度为 1.0 ~ 5.0 mmol/L 时,Lfcin B 的抑菌效果就会丧失。这些盐类对微生物的保护作用取决于金属离子的种类(Mg²⁺ 或 Ca²⁺ > Na⁺ 或 K⁺)、浓度和 Cl⁻ 的浓度^[12]。

进一步的研究表明,保护作用的大小与菌株的种类也相关,这可能是由于这些盐类与细胞的某些成分发生了反应。单价阳离子对 *E. coli* O111 的影响较大,而二价阳离子对 *E. coli* IID-861 的影响较

大^[13] .

5.3 缓冲盐和 pH 值

值(pH 5.5 ~ 7.5)、不同的缓冲盐对 Lfcin B 抑菌效果的影响.

表 2 显示了以 *E. coli* O111 为例,不同的 pH

表 2 不同缓冲盐对 Lfcin B 抑菌效果的影响

缓冲盐		MIC/ (μg/mL)				
名称	浓度/(mmol/L)	pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5
空白	—	12	12	6	6	6
K ₂ HPO ₄	25	12	12	6	6	6
KH ₂ PO ₄	50	12	12	9	9	6
	100	75	60	45	45	45
	25	12	12	6	6	6
Tris-HCl	50	12	12	12	6	6
	100	18	18	18	12	6
HEPES-NaOH	25	12	12	6	6	6
	50	18	18	12	12	12
	100	> 150	> 150	150	24	18
PIPES-NaOH	25	75	48	18	12	12
	50	> 150	45	45	30	24
	100	> 150	> 150	> 150	> 150	> 150

研究表明,随着磷酸钾、Tris、HEPES、PIPES 缓冲液浓度的增加,Lfcin B 的抑菌效果呈下降趋势. Lfcin B 在微碱性条件下更为有效. 随柠檬酸、琥珀酸、乳酸或醋酸的浓度由 25/mmol/L 上升至 100 mmol/L 时,Lfcin B 的活性也会下降.

6 乳铁蛋白活性多肽的应用前景

众多会造成食品污染的致病菌,如大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌等,其活性都会在 Lfcin B 的作用下受到抑制或失活. 鉴于 Lfcin B 的广谱抑菌性,它可以作为天然的防腐剂广

泛地应用于食品、化妆品,还可以作为预防和治疗感染性疾病的新型临床食品和医药制品中的功能性成分,对于刚出生的婴儿尤其有益. 如今,bLF 已成为乳品工业的一种新型产品,以此为初始原料,大规模地生产 Lfcin B 是完全可以实现的.

虽然关于活性多肽的完整的生理功能的描述还不尽完善,用于不同类型的食品及化妆品、保健食品中的有效 Lfcin 浓度还有待于进一步的研究和确定,但可以肯定的是,Lfcin B 作为一种天然的抑菌剂,符合人们日益增长的对不含人造防腐剂的绿色产品的追求,可以广泛地应用于商业产品中.

参考文献：

[1] BELLAMY W, TAKASE M, YAMAUCHI K. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin[J]. **Biochem et Biophy Acta**, 1992, 1121 :130 ~ 136.

[2] SHIMAZAKI K. Separation and Utilization of bovine lactoferrin[J]. **Japanese Journal of Dairy and Food Science**, 1989,38 : 277 ~ 283.

[3] HIROAKI A, HITOSHI S, HIROSHI M. Heat stability of bovine lactoferrin at acidic pH[J]. **J Dairy Sci**, 1991, 74 :65 ~ 71.

[4] TOMITA M, BELLAMY W, TAKASE M. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin[J]. **J Dairy Sci**, 1991, 74 :4137 ~ 4142.

[5] BELLAMY W, TAKASE M, WAKABASHI K. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin[J]. **J Applied Bacteriology**, 1992,73 :472 ~ 479.

[6] HWANG P M, ZHOU N, SHAN X. Three-dimensional solution structure of lactoferricin B,an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin[J]. **Biochemistry**, 1998, 37 :4288 ~ 4298.

[7] DIONYSIUS D A, MILNE J M. Antibacterial peptides of bovine lactoferrin :purification and characterization[J]. **J Dairy Sci**, 1997, 80 :667 ~ 674.

[8] THOMAS D Y, RAYMOND K N. Lactoferrin :The role of conformational changes in its iron binding and release[J]. **J Am Chem Soc**, 1993,115 :6765 ~ 6768.

[9] SHIMAZAKI K, TAZYNE T, UJI K. Properties of a heparin-binding peptide derived from bovine lactoferrin[J]. **J Dairy Sci**, 1998, 81 :2841 ~ 2849.

[10] SCHRODER G, BRANDENBURG K, SEYDEL U. Polymyxin B induces transient permeability fluctuations in asymmetric planar lipopolysaccharide /phospholipid bilayers[J]. **Biochemistry**, 1992, 31 :631 ~ 638.

[11] RANA F R, MACIAS E A, SULTANY C M. Interactions between magainin 2 and Salmonella typhimurium outer membranes effect of lipopolysaccharide structure[J]. **Biochemistry**, 1991, 30 :5858 ~ 5866.

[12] ELLISON R T, LAFORCE F M, GIEHL T J. Lactoferrin and transferring damage of the Gram-negative outer membrane is modulated by Ca^{2+} and Mg^{2+} [J]. **J General Microbiology**, 1990, 136 :1437 ~ 1446.

[13] DIONYSIUS D A, GRIEVE P A, MILNE J M. Forms of lactoferrin :their antibacterial effect on enterotoxigenic Escherichia coli[J]. **J Dairy Sci**, 1993, 76 :2597 ~ 2606.

(责任编辑 秦和平)

启 事

经教育部批准,无锡轻工大学、江南学院、无锡教育学院于 2001 年 2 月 13 日合并成立江南大学。对于本校作者在本刊发表的论文,2001 年 2 月 12 日及其以前所投稿件,刊登时署并校前原单位名称 ;2001 年 2 月 13 日及其以后所投稿件,刊登时一律署江南大学。

特此说明。

《无锡轻工大学学报》编辑室
2001 年 5 月 30 日