

文章编号:1673-1689(2005)02-0001-05

乳铁素 B 的抗菌活性及其影响因素

张东送^{1,2}, 庞广昌¹, 谷芳¹, 王彦², 刘萍²

(1. 天津商学院 生物工程系, 天津 300134; 2. 海军后勤学院, 天津 300450)

摘要: 乳铁素 B 是牛乳铁蛋白经胃蛋白酶酶解后得到的最重要的抗菌肽, 具有较强抗菌活性. 研究表明, 乳铁素 B 对大肠杆菌的最小抑菌质量浓度为 0.5 mg/mL, 对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度为 0.4 mg/mL; 葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、牛血清白蛋白(BSA)、尿素、硫酸铵在 0~10 mg/mL, 乳糖、可溶性淀粉在 0~4 mg/mL 的质量浓度范围内, 对乳铁素 B 的抗菌活性影响不大; 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, 乳铁素 B 的抗菌活性就会大大降低; 随着缓冲盐浓度和有机酸浓度(25~100 mmol/L)的增大, 乳铁素 B 的抗菌活性呈下降趋势, 且在微碱性环境下乳铁素 B 表现出较强的抗菌活力.

关键词: 乳铁素 B; 抗菌作用; 影响因素

中图分类号: TS 252.1

文献标识码: A

The Antibacterial Activity and Influential Factors of Lactoferricin B

ZHANG Dong-song^{1,2}, PANG Guang-chang¹, GU Fang¹, WANG Yan², LIU Ping²

(1. The Department of Bioengineering, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China; 2. Logistics Institute of the P. L. A. Navy, Tianjin 300450, China)

Abstract: Lactoferricin B (Lfcin-B) is the main antimicrobial peptide generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin (BLf). Lfcin-B also shows a significant antibacterial activity than that of lactoferrin. In this paper, the antibacterial activity of Lfcin-B was studied. It was found that the MIC of Lfcin-B repressing *E. coli* and *S. aureus* is 0.5 mg/mL and 0.4 mg/mL, respectively. Glucose, sucrose, maltose, BSA, urea, ammonium sulphate at concentration 0~10 mg/mL, and lactose, starch at concentration 0~4 mg/mL have no effect on the antibacterial activity of Lfcin-B. The antibacterial effectiveness was reduced in presence of NaCl or KCl at concentration 25~100 mmol/L, MgCl₂ or CaCl₂ at concentration 1.0~5.0 mmol/L, or in presence of various buffer salts. The effectiveness declined with concentrations increases of various buffers salts or carboxylic acids within the range of 25 to 100 mmol/L. Furthermore, the protein was most effective under slightly alkaline conditions in each case.

Key words: lactoferricin B (Lfcin-B); antibacterial activity; influential factors

乳铁蛋白(Lactoferrin, 简称 Lf)是富含在初乳 中的一种功能因子, 具有抗菌活性等多种生物学功

收稿日期: 2004-06-03; 修回日期: 2004-10-28.

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号 30170685)资助课题.

作者简介: 张东送(1971-), 男, 安徽安庆人, 讲师, 工学硕士.

能. 近代研究表明, Lf 虽然具有抗菌活性, 但酶解 Lf 得到的抗菌肽的抗菌活性远远高于 Lf, 有若干种抗菌肽已从 Lf 的酶解液中获得. 乳铁素 (Lactoferricin) 就是胃蛋白酶酶解 Lf 所得到的最重要的抗菌肽, Lf 降解生成乳铁素后抗菌活性大大增强^[1]. Tomita 等^[2]研究了牛乳铁蛋白(简称 BLf)经蛋白酶酶解后的活性多肽的抗菌性能. 利用胃蛋白酶酶解牛乳或人乳 Lf, 分别产生乳铁素 B (lactoferricin Bovine, 简称 Lfcin-B) 和乳铁素 H (Lactoferricin Human, 简称 Lfcin-H) 两种. Lfcin-B 有 25 个氨基酸残基组成, 相对分子质量为 3 126, Lfcin-H 有 47 个氨基酸残基组成, 氨基酸顺序也已测出. Lfcin-B 和 Lfcin-H 均不易被胃蛋白酶进一步酶解, 均具有很强的杀菌、抑菌能力, 且抗菌活性超过天然 Lf^[3]. 由于乳铁素具有广谱抗菌特性, 对很多食品病原细菌有杀灭效果, 有望作为一种天然抗菌组分获得广泛应用. 为此, 作者开展了 Lfcin-B 的抗菌活性的研究, 确立了 Lfcin-B 对大肠杆菌 (*E. coli*) 和金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 的最小抑菌浓度, 研究了不同的碳源、氮源、无机盐、有机酸、缓冲液及不同 pH 值对其抗菌活性的影响, 为其在食品及医药行业应用提供依据.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

牛乳铁蛋白: 纯度 80% 以上, 天津商学院生化实验室制备; 营养琼脂: 化学纯; 胃蛋白酶: Sigma 公司产品, 华美生物工程公司进口分装; 胰蛋白胨: OXOID LTD, BASINGSTOKE, HAMPSHIRE, ENGLAND 产品; 牛血清白蛋白: BSA, 华美生物工程公司产品; 其它试剂均为分析纯, 大肠杆菌 (*E. coli*)、金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*): 天津商学院微生物教研室保藏.

VIS-723 型可见光分光光度计: 上海精密科学仪器有限公司生产; 电热恒温水浴锅: 北京市医疗设备总厂生产; HH-B11 型电热恒温培养箱: 上海市跃进医疗器械一厂生产; Waterproof pHScan 2 Tester pH 计: 新加坡产品; 低温离心机: BECKMEN 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 Lfcin-B 的制备 将 BLf 溶于蒸馏水中, 质量浓度为 50 g/L, 调 pH 值到 3.0. 加入质量分数 3% 的胃蛋白酶, 37 °C 恒温反应 4 h, 然后 80 °C, 15 min 终止反应. 调 pH 值到 7.8, 离心 (15 000 g), 取上清液调整 pH 值至中性, 用截留相对分子质量

为 10 000 的超滤膜进行超滤, 反复超滤 3~4 次. 相对分子质量小于 10 000 的产品用截留相对分子质量为 6 000 的膜再进行超滤, 相对分子质量低于 6 000 的透过液立即进行冷冻干燥 (Lfcin-B 的相对分子质量为 3 126), 于 4 °C 保存备用^[4].

1.2.2 确定 Lfcin-B 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的最小抑菌质量浓度 活化菌种, 制备菌悬液, 调菌浓为 10^7 个/mL. 配制质量浓度分别为 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10, 15, 20, 30 mg/mL 的 Lfcin-B 溶液. 取无菌的装有 8 mL PYG 培养基 (蛋白胨 mg/dL, 葡萄糖 1 mg/dL, 酵母膏 0.5 mg/dL, pH 值 6.8) 试管, 分别加入 1 mL CFU 为 10^7 个/mL 的菌悬液及 1 mL Lfcin-B 溶液, 使 Lfcin-B 的最终质量浓度为 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 mg/mL. 每一质量浓度的 Lfcin-B 溶液平行做 2 次. 将试管置于恒温培养箱中 37 °C 培养 9 h, 另将一支不加 Lfcin-B 的试管置于冰箱保存作空白, 然后在 560 nm 处测定 A. 其中 A 为 0 的 PYG 培养基中所加的最小 Lfcin-B 质量浓度即是 Lfcin-B 的最小抑菌质量浓度 (MIC).

1.2.3 不同影响因素对 Lfcin-B 抗菌活性的影响

1) 不同碳源对 Lfcin-B 抗菌活性的影响: 实验选取的碳源包括: 葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉. 制备质量浓度分别为 0, 2, 20, 100, 200 mg/mL 的各种碳源溶液 (乳糖和可溶性淀粉质量浓度为 0, 0.8, 8, 40, 80 mg/mL). 取无菌的 7.5 mL 基础培养基 (胰蛋白胨 7 g/L, pH 值 6.8) 试管, 分别加入 0.5 mL 碳源溶液, 1 mL CFU 为 10^7 个/mL 的菌悬液及 1 mL 最终浓度为最小抑菌质量浓度下的 Lfcin-B 溶液, 使各种碳源的最终质量浓度为 0, 0.1, 1, 5, 10 mg/mL (乳糖和可溶性淀粉为 0, 0.04, 0.4, 2, 4 mg/mL). 每一质量浓度的碳源溶液平行做 2 次. 将试管置于恒温培养箱中 37 °C 培养 9 h, 另将一支不加碳源溶液的试管置于冰箱保存用作空白, 然后测定 A 值.

2) 不同氮源对 Lfcin-B 抗菌活性的影响: 实验选取的氮源包括: 牛血清白蛋白 (BSA)、尿素、硫酸铵. 各种氮源的最终质量浓度为 0, 0.1, 1, 5, 10 mg/mL, 其它方法同 1).

3) 离子强度对 Lfcin-B 抗菌活性的影响: 实验选取的盐类包括: NaCl, KCl, CaCl_2 , MgCl_2 . NaCl 及 KCl 溶液的最终浓度为 0, 25, 50, 75, 100 mmol/L, CaCl_2 及 MgCl_2 溶液的最终浓度为 0, 1.25, 2.5, 3.75, 5.0 mmol/L, 其它方法同 1).

4) 缓冲盐及其 pH 值对 Lfcin-B 抗菌活性的影响: 实验中选取的缓冲盐包括: Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 , Tris-HCl . Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 及 Tris-HCl 缓冲液溶液的浓度为 0, 25, 50, 100 mmol/L, 其它方法同 1)。

5) 有机酸及其 pH 值对 Lfcin-B 抗菌活性的影响: 实验中选取的有机酸包括: 柠檬酸、乳酸。有机酸溶液的浓度为 0, 25, 50, 100 mmol/L, 其它方法同 1)。

2 结果与分析

2.1 Lfcin-B 最小抑菌质量浓度的确定

测定培养 9 h 后的 *E. coli* 培养物和 *S. aureus* 培养物的光密度(560 nm), 根据各自的平均值做出 A-Lfcin-B 质量浓度曲线(见图 1)。

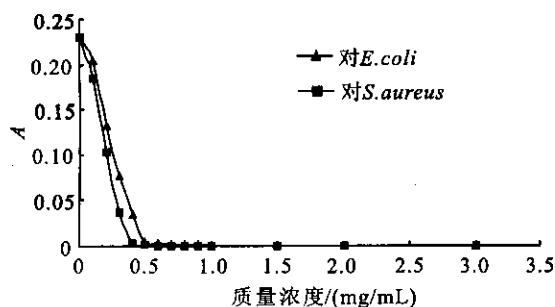


图 1 不同质量浓度 Lfcin-B 对 *E. coli* 及 *S. aureus* 生长量的影响

Fig. 1 Effect of the Lfcin-B concentration on the growth of *E. coli* or *S. aureus*

由图 1 曲线可知,随着 Lfcin-B 质量浓度增加, *E. coli* 培养物及 *S. aureus* 培养物的 A 值逐渐下降,表明其抗菌活性逐渐增强,在其质量浓度达到 0.5 mg/mL 时, *E. coli* 基本停止了生长,当 Lfcin-B 质量浓度 >0.5 mg/mL 时, *E. coli* 培养物的 A 值几乎都为 0。由此可知, Lfcin-B 对 *E. coli* 的 MIC 为 0.5 mg/mL, 同理, Lfcin-B 对 *S. aureus* 的 MIC 为 0.4 mg/mL。另外, Lfcin-B 对 *S. aureus* 的 MIC 比对 *E. coli* 对 MIC 小,这可能源于两种菌细胞壁的组成不同, *S. aureus* 比 *E. coli* 对 Lfcin-B 更敏感。

2.2 不同因素对 Lfcin-B 抗菌活性的影响

2.2.1 不同碳源对 Lfcin-B 抗菌活性的影响 测定培养 9 h 后 *E. coli* 培养物的光密度(560 nm), 根据其平均值做出 A 质量浓度曲线。

由于碳水化合物是食品中的主要成分,所以实验中分析了几种常见碳源对 Lfcin-B 抗菌活性的影响。从图 2 和图 3 中可以看出,随着碳源质量浓度

的增加(0~10 mg/mL), *E. coli* 培养物的 A 值几乎不变,说明所加碳源对 Lfcin-B 的抗菌活性基本没有影响。另外,由于所加的 Lfcin-B 质量浓度为 Lfcin-B 对 *E. coli* 的 MIC, 根据添加碳源后培养物的 A 值仍然几乎为 0 也可知,实验中所选的几种碳水化合物对 Lfcin-B 的抗菌活性基本没有影响。

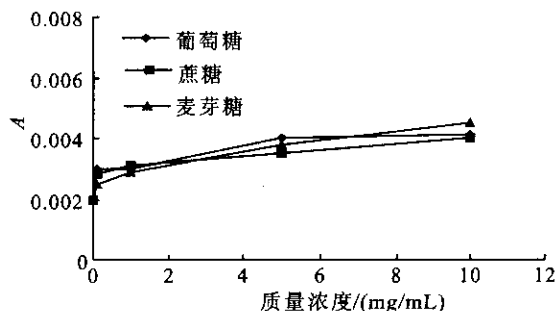


图 2 葡萄糖、蔗糖、麦芽糖对 Lfcin-B 抗菌活性的影响

Fig. 2 Effect of glucose, sucrose and maltose on the antibacterial activity of Lfcin-B

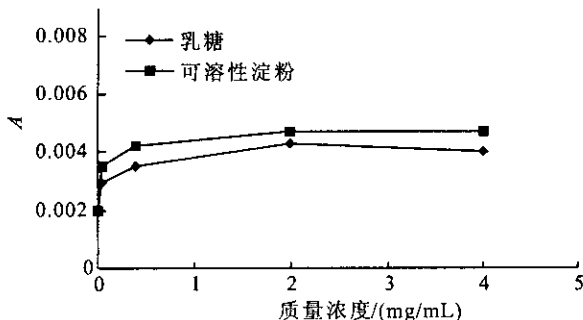


图 3 乳糖、可溶性淀粉对 Lfcin-B 抗菌活性的影响

Fig. 3 Effect of lactose and starch on the antibacterial activity of Lfcin-B

2.2.2 不同氮源对 Lfcin-B 抗菌活性的影响 测定培养 9 h 后 *E. coli* 培养物的光密度(560 nm), 根据其平均值做出 A-质量浓度曲线。

由图 4 可知, BSA、尿素、硫酸铵在质量浓度为 0~10 mg/mL 的范围内, *E. coli* 培养物的 A 值几乎不变,接近于 0, Lfcin-B 完全保留其原有抗菌活性,这说明所加氮源对 Lfcin-B 的抗菌活性基本没有影响。

2.2.3 离子强度对 Lfcin-B 抗菌活性的影响 测定培养 9 h 后 *E. coli* 培养物的光密度(560 nm), 根据其平均值作出 A-质量浓度曲线。

由图 5、图 6 中曲线可以得出,当有浓度为 25~100 mmol/L 的 NaCl 或 KCl, 或者 1.25~5.0 mmol/L 的 CaCl_2 或 MgCl_2 存在时, *E. coli* 培养物的 A 值随离子强度增大而增加,表明 Lfcin-B 的抗菌活性受到离子强度的影响而减弱,而且随着离子强度的增大, Lfcin-B 的抗菌活性逐渐降低,而且二价阳离子比一价阳离子影响更大(Ca^{2+} , $\text{Mg}^{2+} > \text{K}^+$, Na^+)。这可能是因为高浓度的盐类会增强疏水反

应,促进蛋白类抗菌肽的高分子聚合反应,从而改变了 Lfcin-B 的分子构象,使其抗菌活性降低.

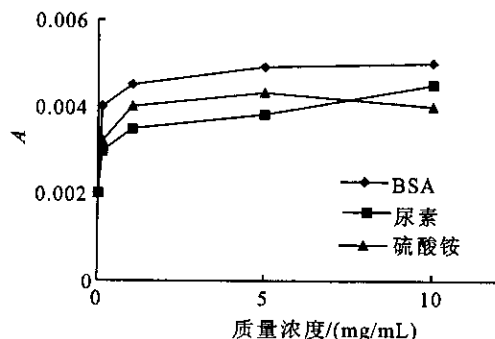


图4 BSA、尿素、硫酸铵对 Lfcin-B 抗菌活性的影响

Fig. 4 Effect of BSA, urea and ammonium sulphate on the antibacterial activity of Lfcin-B

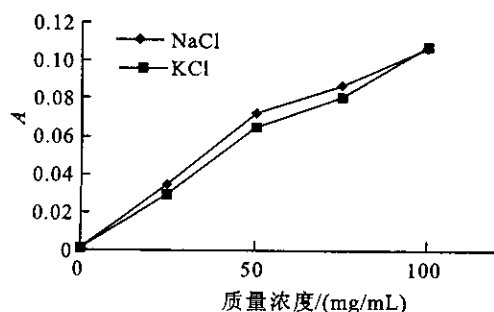


图5 NaCl、KCl 对 Lfcin-B 抗菌活性的影响

Fig. 5 Effect of NaCl and KCl on the antibacterial activity of Lfcin-B

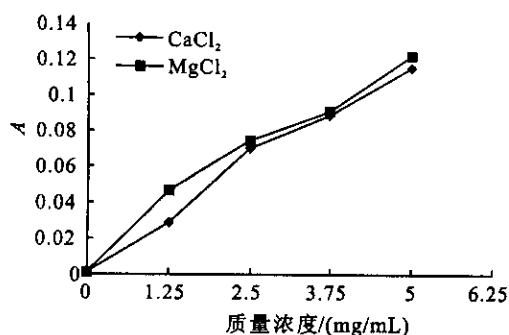


图6 CaCl₂、MgCl₂ 对 Lfcin-B 抗菌活性的影响

Fig. 6 Effect of CaCl₂ and MgCl₂ on the antibacterial activity of Lfcin-B

2.2.4 缓冲盐及其 pH 值对 Lfcin-B 抗菌活性的影响

1) A-pH 值曲线:用 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液测定培养 9 h 后 *E. coli* 培养物的光密度 (560 nm), 根据其平均值做出 A-pH 值曲线.

由图 7 中曲线可知,随着 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液浓度的增大, *E. coli* 培养物的 A 值增加,这说明 Lfcin-B 的抗菌效果呈现下降趋势,随着 pH 值从 5.5 增加到 7.5, *E. coli* 培养物的 A 值逐渐降

低,说明酸性环境对 Lfcin-B 抗菌活性影响较大,在微碱性 pH 值环境下 Lfcin-B 抗菌活性影响较小.

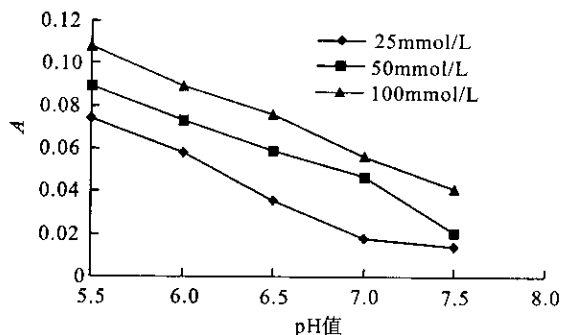


图7 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液及其不同的 pH 值对 Lfcin-B 抗菌活性的影响

Fig. 7 Effect of Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ buffer and pH on the antibacterial activity of Lfcin-B

2) Tris-HCl 缓冲液:测定培养 9 h 后 *E. coli* 培养物的光密度 (560 nm), 根据其平均值做出 A-pH 值曲线.

由图 8 可知,随着 Tris-HCl 缓冲液浓度的增大, Lfcin-B 的抗菌效果呈现下降趋势,酸性环境比微碱性 pH 值环境对 Lfcin-B 的抗菌活性影响大,在微碱性 pH 值环境下 Lfcin-B 表现出较强的抗菌活性.

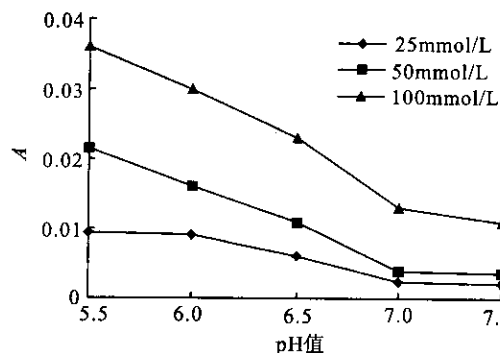


图8 Tris-HCl 及其不同的 pH 值对 Lfcin-B 抗菌活性的影响

Fig. 8 Effect of Tris-HCl buffer and pH on the antibacterial activity of Lfcin-B

2.2.5 有机酸和 pH 值对 Lfcin-B 抗菌活性的影响

1) 柠檬酸:测定培养 9 h 后 *E. coli* 培养物的光密度 (560 nm), 根据其平均值做出 A-pH 值曲线.

由图 9 可知,随着柠檬酸浓度的增大, *E. coli* 培养物的 A 值增加,这说明 Lfcin-B 的抗菌效果呈现下降趋势,随着 pH 值从 5.5 增加到 7.5, *E. coli* 培养物的 A 值逐渐降低,说明酸性环境对 Lfcin-B 抗菌活性影响较大, Lfcin-B 在微碱性 pH 值环境下表现较强的抗菌活性.

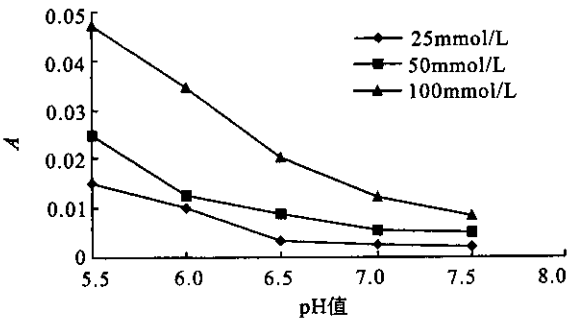


图 9 柠檬酸及其不同的 pH 值对 Lfcin-B 抗菌活性的影响

Fig. 9 Effect of citric acid and pH on the antibacterial activity of Lfcin-B

2) 乳酸:测定培养 9 h 后 *E. coli* 培养物的光密度(560 nm),根据其平均值做出 A-pH 值曲线.

由图 10 可知,随着乳酸浓度的增大,Lfcin-B 的抗菌活性呈现下降趋势,酸性环境比微碱性 pH 值环境对 Lfcin-B 影响较大. Lfcin-B 在微碱性 pH 值环境下表现出较强的抗菌活性.

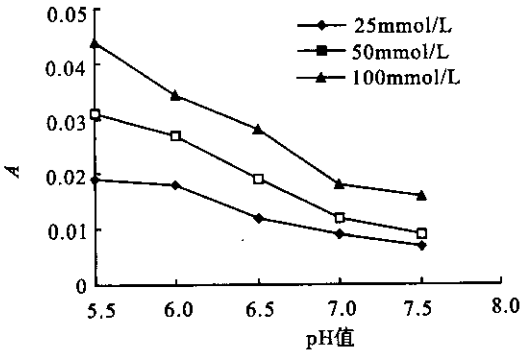


图 10 乳酸及其不同的 pH 值对 Lfcin-B 抗菌活性的影响

Fig. 10 Effect of lactic acid buffer and pH on the antibacterial activity of Lfcin-B

在缓冲液和有机酸为酸性的环境中,介质中的阳离子会中和细胞表面的负电荷,降低了具有亲膜活性的 Lfcin-B 与细胞表面致死靶位的亲和性,从而使其抗菌活性降低^[5]. 所以,在 Lfcin-B 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.

3 结 论

实验表明,Lfcin-B 对 *E. coli* 的 MIC 为 0.5 g/mL,对 *S. aureus* 的 MIC 为 0.4 g/mL. 实验中所选的碳源和氮源多数是食品中的常见组分,其对 Lfcin-B 的抗菌活性影响不大,葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、牛血清白蛋白(BSA)、尿素、硫酸铵在 0~10 g/mL,乳糖、可溶性淀粉在 0~4 g/mL 的质量浓度范围内,对 Lfcin-B 的抗菌活性几乎没有影响. 高浓度的盐类会增强疏水反应,从而促进 Lfcin-B 的高分子聚合反应,会影响到其抗菌活性. 当 NaCl 或 KCl 的浓度为 25~100 mol/L,MgCl₂ 或 CaCl₂ 的浓度为 1.0~5.0 mol/L 时,Lfcin-B 的抗菌效果就会大大降低. 随着缓冲液和有机酸浓度(25~100 mol/L)的增大,Lfcin-B 的抗菌活性呈现下降趋势,酸性环境比微碱性 pH 环境对 Lfcin-B 的抗菌活性影响大. 所以,Lfcin-B 作为天然的抗菌组分可以有选择性地应用到相关食品(低盐、均相食品等)中,但有关其抗菌图谱和在食品中的最适添加量还有待于进一步的研究.

参考文献:

[1] Bellamy, Takasem. Antibacterial spectrum of lactoferricinB, a potent bactericidal peptides derived from the N terminal region of bovine lactoferrin[J]. *J Applied Bacteriology*, 1992,73:472—479.

[2] Tomita Mamoru. Potent antibacterial generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin[J]. *J Dairy Sci*, 1991, 74: 4137—4142.

[3] Malkoski Marina, Kappacin. A novel antibacterial peptide from bovine milk[J]. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2001, 8:2309—2315.

[4] Yamauchi K. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment[J]. *Infect Immun*, 1993,61 (2):719—728.

[5] Dalmastri C P, Valenti P, Visca P, *et al*, Enhanced antimicrobial activity of lactoferrin by binding to the bacterial surface [J]. *Microbiological*, 1988, 11:225.

(责任编辑:杨 萌)