

酶法制备乳铁蛋白抗菌肽的工艺

王新保^{1,2}, 卢蓉蓉^{1,2}, 任 举^{1,2}, 杨瑞金¹, 张文斌²

1(江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏无锡, 214122)

2(江南大学食品学院, 江苏无锡, 214122)

摘 要 乳铁蛋白具有抗菌活性, 胃蛋白酶酶解乳铁蛋白时得到的乳铁蛋白多肽的抗菌活性远高于其自身。通过响应面回归分析, 得到了胃蛋白酶酶解乳铁蛋白的优化条件为: 底物浓度 30 mg/mL、水解时间 2 h、温度 45℃、加酶量 1%(w/w)、pH 2.5。在优化酶解条件下, 水解度约为 11%, 抑菌率为 98.8%。高效液相排阻色谱分析表明, 多肽的分子质量主要分布在 200~6 000 u。

关键词 乳铁蛋白, 抗菌肽, 水解度, 抑菌率, 胃蛋白酶

乳铁蛋白(lactoferrin, 以下简称 LF)是富含在初乳中的一种功能因子, 具有抗菌活性等多种独特的生物活性。近年来, 科学家们利用分子生物学原理, 在实验室完成了对 LF 功能的研究, 确定了它对人体所具有的七大功能: 如广谱抗菌活性^[1,2]、增强铁的传递和吸收^[3,4]、免疫调节作用^[5]、抗病毒作用^[6,7]、抗氧化作用^[8,9]和抗癌作用^[10,11]。

Tomita 等^[12]研究了 LF 经蛋白酶水解后的活性多肽的抑菌性能, 发现经猪胰蛋白酶的作用水解得到的小分子多肽具有广谱抗菌性能, LF 水解多肽的抑菌活性明显高于其自身。Saifo 等^[13]研究发现, LF 在酸性条件下(pH 4.0)对热处理具有较强的耐受力, 但在 pH 2.0 时进行热处理, 则会导致 LF 发生不同程度的水解, 水解度(degree of hydrolysis, 以下简称 DH)达 10%时的产物(120℃水解 15 min)在 10 mg/mL 的浓度条件下, 显示出比未经酸热处理的 LF 更强的抗菌活性。

为了得到较强抗菌性的 LF 水解多肽, 本文以牛 LF 为原料, 以其水解产物为研究对象, 选取大肠杆菌(*E. coli*)为实验菌株, 旨在通过对酶解条件的工艺研究以及响应面回归分析对酶解条件进行优化, 以得到产生抗菌肽的最佳酶解条件。

1 材料与方法

1.1 实验材料

LF, DMV 公司(纯度 95%); 三硝基苯磺酸(trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS), Sigma 公司; 胃蛋白酶(EC3.4.23.1), Sigma 公司(食品级纯), 537 酸性蛋白酶, 无锡雪梅酶制剂有限公司; AS1398 中性

蛋白酶, 无锡雪梅酶制剂有限公司; Alcalase 碱性蛋白酶, Novo 公司; 胰蛋白酶, Novo 公司; 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS), 国药试剂有限公司(化学纯); 基本培养基, 胰蛋白胨, 牛肉浸膏等为生化试剂, 其他试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

VIS-722 型分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; DRP-9082 隔水式电热恒温培养箱, 上海森信实验仪器有限公司; YX-400B 双层立式蒸汽压力消毒器, 上海三申医疗器械有限公司; HHS11-213 型电热恒温水浴锅, 上海医疗器械五厂; 4K15 冷冻离心机, Sigma 公司; LGJ-10 冷冻干燥器, 北京四环科学仪器厂; VD-650 桌上洁净操作台, 无锡超净净化空调设备有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 LF 酶解工艺

将一定质量浓度的 LF 溶液加入反应容器中, 在适当温度的恒温水浴中不断搅拌, 达到酶解温度后, 保温 5 min 左右, 用 1.0 mol/L 的 HCl 或 NaOH 调整 pH 值至酶的最适值, 加入蛋白酶。在反应过程中不断搅拌, 并滴加 1.0 mol/L HCl 或 NaOH 以维持 pH 恒定不变。在最适温度条件下酶解一定时间, 反应到终点, 停止搅拌, 并将温度迅速升到 80℃, 维持 15 min 以钝化酶。添加 1.0 mol/L HCl 或 NaOH 调整 pH 至 7.0, 15 000 ×g 冷冻离心 30 min。上清液置于 4℃冷藏备用^[14]。

1.3.2 水解度的测定

蛋白质 DH 是指在蛋白质水解反应过程中被裂解的肽键占蛋白质总肽键的百分数。

在碱性或中性条件下水解时, DH 的测定采用 pH-Stat 法^[15]。酸性条件下水解时, 采用 TNBS

第一作者: 硕士研究生(卢蓉蓉教授为通讯作者)。

收稿日期: 2007-07-27, 改回日期: 2007-12-18

法^[16]。

1.3.3 抑菌率的计算

抑菌率的测定采用平板计数法^[17,18]。将保存的菌种接种于营养琼脂斜面培养基上(若干支),于37℃培养24 h,连续活化2次。经2次活化的实验菌种,加无菌生理盐水洗涤后,转移至无菌试管并振荡使菌体分布均匀。根据吸光度值($A_{560\text{nm}}$)与菌液浓度关系标准曲线,将菌液调至 10^6 cfu/mL。取装有4 mL肉汤蛋白胨培养基(蛋白胨1%-牛肉浸膏0.3%-NaCl 0.5%)的试管,分别编号,各试管加入菌液为 10^6 的菌液0.5 mL,然后分别加入不同酶解条件下LF水解肽溶液0.5 mL,然后置于(37±1)℃摇床培养。培养6 h后,平板计数。抑菌性大小用Y表示,计算公式为:

$$Y/\% = \frac{\text{对照组菌浓} \times \text{实验组菌浓}}{\text{对照组菌浓}} \times 100$$

1.3.4 相对分子质量分布的测定方法

用高效液相排阻色谱(high performance size exclusion chromatography, HPSEC)检测 LF 多肽的相对分子质量分布。

仪器: Waters 600 高效液相色谱仪(配 2487 紫外检测器(波长 220 nm)和 M 32 工作站);

色谱柱: TSKgel 2000 SWXL 300 nm×7.8 mm
流动相体积比: V(乙醇): V(水): V(氯乙酸)
=45: 54: 1;

检测波长: 220 nm; 流量: 0.5 mL/min; 柱温: 30℃;

样品制备: 吸取样品 2 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用流动相稀释到刻度, 用微孔过滤膜过滤后进样。

1.3.5 数据统计及分析

文中数据为 3 次平行测定值的平均值。工艺优化实验采用 SAS 统计软件 V8.1 RSREG(response surface regression)程序进行响应面回归分析, 采用 Design Expert (Version 7.1.2, State-ease Inc., Minneapolis, MN, USA, 2005)作响应面图和等值线图, 采用 SPSS 13.0 进行相关性分析。

2 结果与讨论

2.1 酶的筛选

从图 1 中看出, DH 随着水解时间的延长不断升高, 但不同反应时间反应趋势明显不同。在开始的 15 min 内, DH 显著升高, 随着水解的进行, 增加趋势减缓, 但仍呈上升趋势。2~4 h 增加趋势更加平

缓, 变化很小。因此, 将 LF 的水解时间定为 2 h。

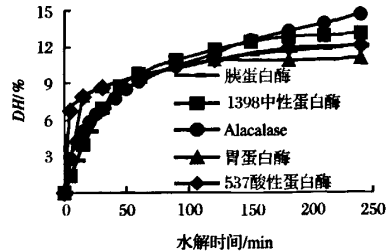


图 1 各种蛋白酶对 LF 的水解进程曲线

不同蛋白酶对酶解 LF 制备抗菌肽具有很大的影响, 表 1 为 LF 经不同蛋白酶水解后的水解液的抑菌率, 根据表 1 可以看出, 胃蛋白酶酶解制备的肽抗菌性最强, 所以实验中选用胃蛋白酶酶解 LF 制备抗菌肽。

表 1 不同蛋白酶酶解液的抑菌率

酶的种类	抑菌率/%
537 酸性蛋白酶	36.96
胃蛋白酶	86.96
AS1398 中性蛋白酶	46.74
Alcalase 碱性蛋白酶	26.09
胰蛋白酶	67.39

2.2 温度对水解度的影响

温度从蛋白酶催化反应速度及蛋白酶的稳定性 2 个方面影响酶解反应的效率。胃蛋白酶的最适温度一般在 35~55℃, 随底物的不同而有所不同。在 pH 2.0, 加酶量 ($[E]/[S]$) 3%, $[S]$ 50 mg/mL 的条件下, 酶解 2 h, 测定不同温度下的 DH, 结果见图 2。

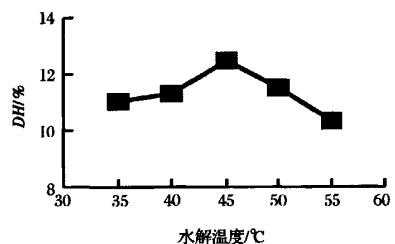


图 2 温度对水解度的影响

由图 2 可知, 温度对 LF 的水解有较大影响, 随着温度升高, DH 先增大后减小。在 35~40℃, DH 上升很慢; 但在 40~45℃ 酶具有较强的活性, DH 上升最快。在 45~55℃ 时, DH 迅速下降。因此, 温度在 45℃ 左右较为适宜。

2.3 底物浓度对水解度的影响

在 pH 2.0, $[E]/[S]$ 为 3%, 温度为 45℃ 的条件

下酶解 2 h,测定不同 $[S]$ 对 DH 的影响,结果见图 3。

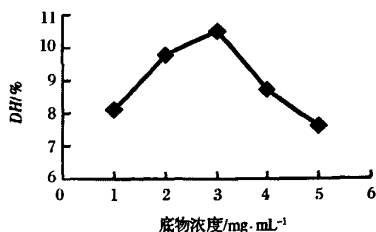


图3 底物浓度对水解度的影响

在酶浓度恒定条件下,当 $[S]$ 很小时(10 mg/mL, 20 mg/mL),随着 $[S]$ 浓度的增加, DH 也逐渐增加。在 $[S]$ 为 30 mg/mL 时, DH 达到最大值。随着 $[S]$ 继续增大, DH 迅速下降。因此,确定 $[S]$ 为 30 mg/mL。

2.4 加酶量对水解度的影响

在 pH 2.0, $[S]$ 30 mg/mL, 45℃ 的条件下酶解 2 h,测定不同 $[E]/[S]$ 条件下的 DH ,结果见图 4。

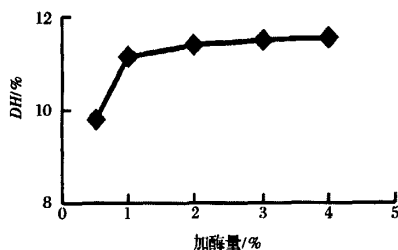


图4 加酶量对水解度的影响

由图 4 可以看出,在 $[E]/[S]$ 为 0.5% 时, DH 较小,在 $[E]/[S]$ 为 1%~4% 时, DH 增加不明显。因此,选择 $[E]/[S]$ 为 1% 左右较为合适。

2.5 pH 值对水解度的影响

在 $[S]$ 30 mg/mL, $[E]/[S] = 1\%$, 45℃ 的条件下酶解 2 h,测定不同 pH 值条件下的 DH ,结果见图 5。

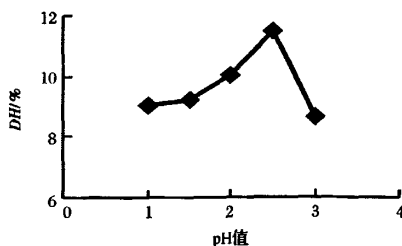


图5 pH 对水解度的影响

由图 5 可见,pH 值在 1.0~1.5 时,水解曲线较平缓;在 2.0~2.5 时,酶的活性较高,水解速度加快, DH 较高;pH 值超过 2.5 时, DH 随 pH 值的增加而

迅速下降。因此,选择 pH 2.5 左右较为合适。

2.6 酶解工艺优化

Adler-Nissen^[16]认为,影响酶解反应主要变量是温度、pH 值、 $[E]/[S]$ 。所以在前面实验基础上,选用胃蛋白酶水解 LF,确定 $[S]$ 为 30 mg/mL、水解时间为 2 h,对酶解温度(X_1)、 $[E]/[S]$ (X_2)及酶解 pH(X_3)进行二次回归设计试验和分析,以 DH 、 Y 为响应值。此次采用 Box-Behnken 设计,因素水平编码见表 2。

表2 酶解工艺优化的因素水平

水平	X_1	X_2	X_3
-1	40	0.5%	2.0
0	45	1.0%	2.5
1	50	1.5%	3.0

2.6.1 利用响应面分析法分析试验结果

实验采用表 2 设置的三因素三水平,分别进行 15 组实验, DH 、 Y 响应值用 SAS 软件的 RSREG 程序进行分析,结果见表 3。

表3 Box-Behnken 试验设计与结果

实验点	X_1	X_2	X_3	$DH/\%$	$Y/\%$
1	-1	-1	0	9.81	95.73
2	-1	1	0	12.77	96.97
3	1	-1	0	9.70	97.37
4	1	1	0	11.16	95.07
5	0	-1	-1	9.35	96.73
6	0	-1	1	8.45	70.33
7	0	1	-1	12.45	96.67
8	0	1	1	11.97	80.67
9	-1	0	-1	10.93	98.83
10	1	0	-1	10.47	96.60
11	-1	0	1	9.78	62.67
12	1	0	1	10.57	67.33
13	0	0	0	13.01	96.50
14	0	0	0	12.99	96.30
15	0	0	0	12.93	96.37

15 个实验点可分为 2 类;其 1 是析因点,自变量取值在所构成的三维顶点,共有 12 个析因点;其 2 是 0 点,为区域的中心点,0 点试验重复 3 次,用以估计实验误差。经回归拟合后,各实验因子对响应值的影响可用下列函数表示:

$$DH = 12.91 - 0.17375X_1 + 1.48X_2 - 0.40375X_3 - 1.18375X_1^2 - 0.375X_1X_2 + 0.3125X_1X_3 - 0.86625X_2^2 - 0.095X_2X_3 - 1.28875X_3^2$$

$$Y = 96.39 + 0.27125X_1 + 1.1525X_2 - 13.47875X_3 - 2.42375X_1^2 - 0.885X_1X_2 + 1.7225X_1X_3 + 2.31875X_2^2 + 2.6X_2X_3 - 12.60875X_3^2$$

根据表 3 的数据作回归显著性检验和方差分析,结果见表 4 和表 5。

表 4 水解度回归方程的方差分析

方差来源	自由度	平方和	平均平方和	F	Pr>F
一次项	3	19.07	6.36	17.49	0.0044 **
二次项	3	12.63	4.21	11.59	0.0109 *
交互项	3	0.99	0.33	0.91	0.5000
回归	9	31.64	3.52	12.93	0.0058 **
误差项	5	1.36	0.27		
总和	14	33.00			

注: * 表示显著, ** 表示高度显著。

表 5 抑菌率回归方程的方差分析

方差来源	自由度	平方和	平均平方和	F	Pr>F
一次项	3	1 466.55	488.85	29.19	0.0013 **
二次项	3	636.67	212.22	12.67	0.0090 **
交互项	3	41.80	13.93	0.83	0.5310
回归	9	2 144.49	238.28	14.30	0.0045 **
误差项	5	83.30	16.66		
总和	14	2 227.79			

从表 4 和表 5 中可以看出,方程一次项的影响都是高度显著的, DH 的二次项的影响也是显著的, Y 的二次项的影响是高度显著的,说明结果分析是可靠的,而交互项不显著,说明因素之间交互作用小,

DH 、 Y 的回归方程是高度显著的。用上述回归方程描述的各因子与响应值与全体自变量之间的线性关系是显著的, R^2 分别为 0.9588、0.9626,方程的 F 值分别为 12.93、14.30,查 F 值的临界值表, $F_{0.01}(9,5)=10.2$, $F(>F_{0.01}(9,5))$,所以 2 个回归方程的回归效果都是高度显著。从统计学意义上讲,该回归方程可作为进一步分析的依据。

2.6.2 交互作用对水解度的影响

3 因素对 DH 的交互作用如图 6 和图 7 所示。由图知, DH 随着温度和 pH 值的增加先增加后减少,而随着酶添加量的增加而不断增加,与单因素实验结果一致。根据 SAS 的最优化分析可以得出影响 DH 的优水平为 pH 2.4、温度 $44^{\circ}C$ 、 $[E]/[S]$ 1.5%。

2.6.3 交互作用对抑菌率的影响

3 因素对 Y 的交互作用如图 8 和 9 所示。由图可知, Y 随着温度和 pH 值的增加先增加后减少,而随着 $[E]/[S]$ 的增加先减小后增加。根据 SAS 的最优化分析可以得出影响抑菌率的最优水平为 pH 2.4、温度 $44^{\circ}C$ 、 $[E]/[S]$ 1.5%。

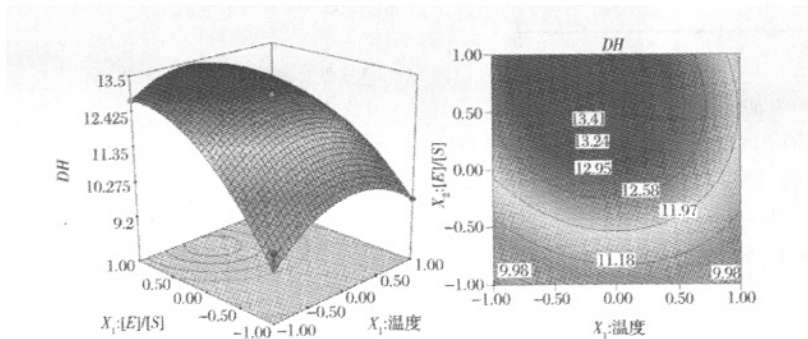


图 6 温度和 $[E]/[S]$ 交互作用的响应面和等值线

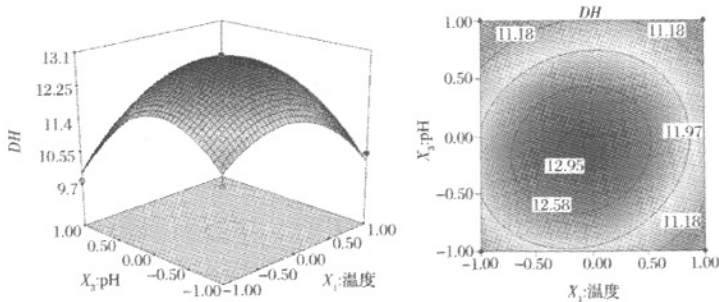


图 7 温度和 pH 值交互作用的响应面和等值线

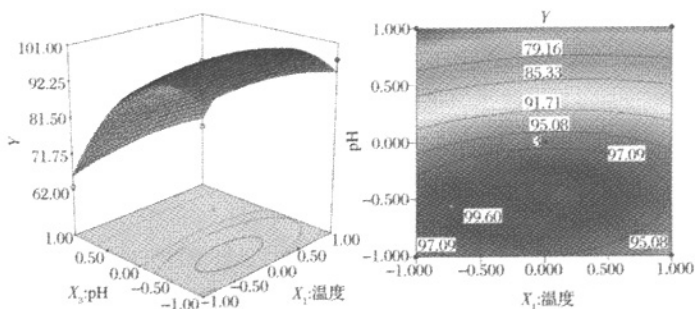
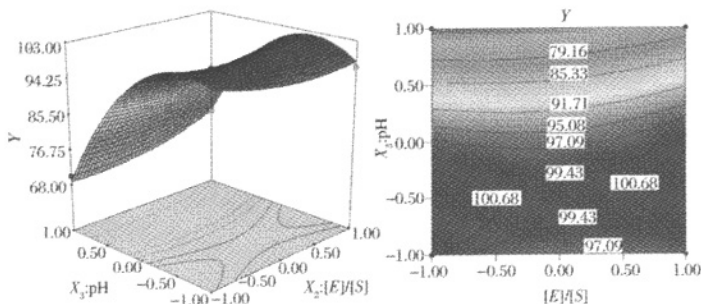


图8 温度和pH值交互作用的响应面和等值线

图9 $[E]/[S]$ 和pH值交互作用的响应面和等值线

2.6.4 最优条件下的水解进程曲线及在不同水解度条件下的抗菌性

通过 RSREG 分析得到胃蛋白酶酶解 LF 制备抗菌肽的最佳水解条件: $[S]$ 30 mg/mL, $[E]/[S]$ 1%, 温度 45℃, pH 2.5。在此条件下酶解 4 h, 分析不同时间下的酶解液的 DH 和 Y 。结果见图 10。

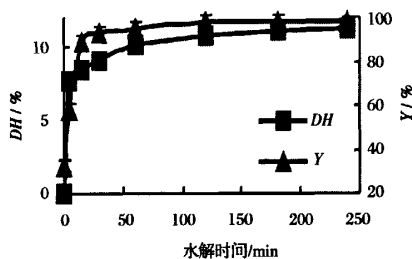


图10 优化水解条件下的水解进程曲线和对应的抗菌性

由图 10 中 DH 进程曲线可知, 在酶解反应的最初 15 min 内, DH 急剧升高; 15 min~2 h, DH 也有明显增加; 2 h 后曲线趋于平缓。从抗菌性变化曲线可知, 经过 15 min 的水解, 抗菌肽的 Y 迅速升高, DH 大约 11% 时, Y 达到最大为 98.3%。应用 SPASS 软件对 DH 与 Y 作相关性分析, 结果显示, 2 者相关系数几乎达到 1.00。说明 LF 水解多肽对胃蛋白酶有很强的耐受性, 它不容易被胃蛋白酶进一步

酶解。

2.7 最优条件下酶解产物的相对分子质量分布

图 11 为 LF 优化条件下经胃蛋白酶酶解, DH 达到 11% 时 LF 酶解产物的 HPSEC 图谱。

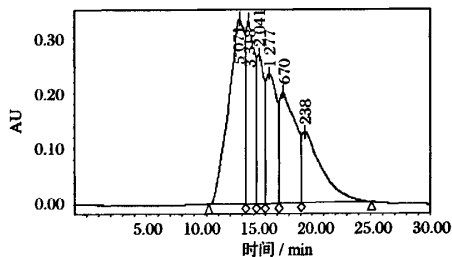


图11 LF 水解多肽的相对分子质量分布

由图 11 可知, 酶解产物中的各组分分布在相对分子质量为 200~6 000 的几个峰之间。其中相对分子质量为 5 017 的峰面积占总面积的 29.25%, 相对分子质量为 3318 的峰面积占总面积的 15.42%, 相对分子质量为 2 041 的峰面积占总面积的 9.93%, 相对分子质量为 1 277 的峰面积占总面积的 13.52%, 此外还含有相对分子质量小于 800 的峰, 面积占总面积的 31.87%。前人研究表明, 抗菌肽的相对分子质量为 4 000 左右, 从 HPSEC 图谱来看, 酶解得到的抗菌肽主要分布在 200~6 000, 与前人的研究有很好的 consistency。

3 结 论

本文用不同蛋白酶酶解 LF, 得出胃蛋白酶是酶解 LF 制备抗菌肽的优良酶源。通过单因素实验和响应面回归分析, 得到了胃蛋白酶酶解 LF 的最佳条件: $[S]$ 30 mg/mL、水解时间 2 h、温度 45℃、 $[E]/[S]$ 为 1%、pH 2.5。此时 DH 大约为 11%, Y 为 98.8%。 DH 与 Y 的相关系数接近 1.00。通过 HPSEC 可知, LF 水解多肽相对分子质量主要分布在 200~6 000。

参 考 文 献

- Kawasaki Y, Tazume S, Shimizu K. Inhibitory effects of bovine lactoferrin on the adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli* to host cells[J]. Biosci. Biotech Biochem, 2000, 64(2): 48~354
- Berkhout B, Floris R, Recio I. Antibacterial effects of the milk protein lactoferrin[J]. Agro-Food- Industry-hi-tech, 2003, 14(3): 32~33
- Nagasako Y, Saita H, Tamura, Y. Iron-binding properties of bovine lactoferrin in iron-rich solution[J]. J Dairy Sci, 1993, 76(7): 1 876~1 881
- Abdallah F, Chahine J E. Transferrins: iron release from lactoferrin[J]. J Mol Biol, 2000, 303: 255~266
- Min F, Zola H, Read L C. Immunoregulatory functions of breast milk and development of the infant intestinal mucosa immune response[J]. J of Nutri Immunol., 2001, 5: 1~15
- Tu Y Y, Cgen, C C, Chang J H. Characterization of lactoferrin(Lf) from colostral whey using anti-Lf antibody immuno- affinity chromatography[J]. J Food Sci, 2002, 67(3): 996~1 001
- Yi M. Hepatitis C virus envelope protein bind lactoferrin[J]. Vriol, 1997, 71(8): 5 997~6 002
- Lindmark M H, Akesson, B. Antioxidative factors in milk British [J]. J of Nutri Immunol, 2000, 84: 103~110
- Medina I, Tombo I, Satue-Gracia M T. Effects of natural phenolic compounds on the antioxidant activity of lactoferrin in liposomes and oil-in-water emulsions[J]. J Agri Food Chem, 2002, 50(8): 2 392~2 399
- Parodi P W. Cow's milk components with anti-cancer potential[J]. Aus J Dairy Tech, 2001, 56(2): 65~73.
- Belzen N. The role of lactoferrin in cancer prevention[J]. Sciences des Aliments, 2002, 22(4): 461~468
- Mamoru Tomita, Wayne Bellamy. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin[J]. J Dairy Sci, 1991, 74: 4 137~4 142
- 王 飞, 温刘发. 乳铁蛋白及其活性肽研究进展[J]. 广东饲料, 2004, 13(4): 21~23.
- D A Dionysius, J M Miline. Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization[J]. J Dairy Sci, 1996, 80: 667~674
- Alder Nissen J. Enzymatic hydrolysis of food protein [M]. London: Elsevier applied science publishers, 1986. 12~14
- Alder Nissen J. Determination of degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid [J]. J Agri Food Chem, 1999, 27: 1 256~1 262
- 吕 锐, 苏冬梅, 孟 林, 等. 罗布麻纤维的抗菌性能的研究[J]. 青岛大学医学院学报, 2006, 42(1): 71~72
- 郭红珍, 姚越红, 王秋芬. 大蒜抑菌作用的研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(2): 414~415

Preparation of Antimicrobial Peptides from Lactoferrin by Enzymatic Hydrolysis

Wang Xinbao^{1,2}, Lu Rongrong^{1,2}, Ren Ju^{1,2}, Yang Ruijin¹, Zhang Wenbin²

1 (State Key labtory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

2 (School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT Lactoferrin (LF) is a kind of multifunctional protein with antimicrobial property. When it was hydrolyzed by pepsin, stronger antimicrobial activity peptides generated. The objective of the study is to optimize the conditions of enzymatic hydrolysis with pepsin. By response surface regression analysis, the optimum enzyme hydrolysis conditions were achieved as substrate ($[S]$) 30 mg/mL, time 2 h, temperature (T) 45℃, enzyme; substrate ratio ($[E]/[S]$) 1% (w/w), and pH 2.5. The resulted degree of hydrolysis (DH) was about 11%, and inhibitory activity (Y) was about 98.8%. By high performance size exclusion chromatography (HPSEC), it was suggested that molecular masses of the digestion of LF by pepsin were between 200~6 000 u.

Key words lactoferrin, antimicrobial peptide, degree of hydrolysis, inhibitory activity, pepsin