

- 80:607-614.
- [25] Meisel H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins [J]. Biopolymers, 1997, 43: 119-128.
- [26] Tomita M, Bellamy W, TaKase M, et al. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin [J]. J Dairy Sci. 1991, 74: 4137-4142.
- [27] 吴建平, 潘文彪. 乳蛋白生物活性肽的研究概述[J]. 中国乳品工业, 1999, 27 (2): 12-15.
- [28] Kampa M, Bakogeorgou E, Hatzoglou A, et al. Opioid alkaloids and casomorphin peptides decrease the proliferation of prostatic cancer cell lines (LNCaP, PC3 and DU145) through a partial interaction with opioid receptors [J]. Eur J Pharmacol. 1997, 335: 255-265.
- [29] Wuryastuti H, Stowe H D, Bull R W, et al. Effects of vitamin E and selenium on immune responses of peripheral blood, colostrum, and leukocytes of sows [J]. J Anim Sci, 1993, 71: 2464-2472.
- [30] Williams P P. Immunomodulating effects of intestinal absorbed maternal colostrum leukocytes by neonatal pig [J]. Can J Vet Res, 1993, 57: 1-8.
- [31] Riedel-Caspari G, Schmidt F W. The influence of colostrum leukocytes on the immune system of the neonatal calf. II. Effects on passive and active immunization [J]. DTW Dtsch Tierarztl Wochenschr, 1991, 98: 190-194.
- [32] Riedel-Caspari G. The influence of colostrum leukocytes on the course of the experimental Escherichia coli infection and serum antibodies in neonatal calver [J]. Vet Immunol Immunopath, 1993, 35: 275-288.

乳铁蛋白的国内外研究动态及趋势

张东送^{1,2}, 庞广昌¹, 胡志和¹, 王彦², 刘萍²

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

摘 要: 乳铁蛋白是一种铁结合性糖蛋白, 具有多种生物学功能, 近年来成为国内外研究的热点。本文综述了乳铁蛋白的近期研究热点: 活性乳铁蛋白的开发应用, 高效表达人乳铁蛋白的转基因技术进展, 工业化生产途径的最新研究以及乳铁蛋白的开发应用前景。

关键词: 乳铁蛋白; 活性乳铁蛋白; 安全性; 研究进展

Review on the Current Status and Development Trend of Lactoferrin both Domestically and Abroad

ZHANG Dong-song^{1,2}, PANG Guang-chang¹, HU Zhi-he¹, WANG Yan², LIU Ping²

(1. Department of Bioengineering; Tianjin University of Commerce, 300134, China; 2. Department of Quartermaster, Navy Logistics College, Tianjin 300450, China)

Abstract: Lactoferrin, an iron-binding glycoprotein, has many biological functions. The latest hot-spot researches of lactoferrin have been reviewed on the activated lactoferrin to produce high levels of human lactoferrin (hLF) in the transgenic organisms and isolation and purification on a large scale. The prospects of the development and application of lactoferrin were also summed up.

Key words: lactoferrin (LF); activated lactoferrin (ALF); safety; researches and progresses

中图分类号: TS252.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-6630 (2004) 03-0192-04

近年来, 世界各地的实验室对乳铁蛋白进行了广泛的研究, 国际上有关乳铁蛋白的专题会议已进行了6次, 乳铁蛋白正成为国内外研究的热点。

乳铁蛋白(Lactoferrin, LF)是一种相对分子质量约为80000Da的铁结合性糖蛋白, 主要存在于哺乳动物的各种外

分泌物中, 如乳汁、眼泪、唾液等。乳汁, 尤其是初乳中LF的含量很高, 如牛初乳中的LF质量浓度为1g/L^[1]。LF具有许多独特的生物学功能: 增强铁的传递和吸收; 广谱的抗菌性; 免疫作用; 抗氧化作用; 促进肠道菌群的平衡; 作为生长因子; 抗炎症; 抗病毒; 抗癌作用等^[2-4]。以下是LF近期的

收稿日期: 2003-08-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170685)

作者简介: 张东送(1971-), 男, 讲师, 硕士, 主要研究方向为食品生物技术。

研究动态及趋势。

1 活性乳铁蛋白的开发应用

1.1 活性乳铁蛋白的概念及功能

活性乳铁蛋白(Activated lactoferrin,以下简称ALF),也称改良的乳铁蛋白,是牛奶中天然存在的蛋白质LF的一种改良的结构形式(专利技术, Naidu,2001),是将LF固定在食品级的糖胺聚糖(富含半乳糖的多糖或角叉藻聚糖)上,溶解在预先调整好的磷酸盐/碳酸盐比例的缓冲液中(含有NaCl和一些过量的非固定化LF)而形成^[9]。这样形成的ALF同样具有LF的生物学功能和更强的抗菌活性,能阻碍微生物的吸附或粘附,促进生物体表面活的或死的微生物分离,抑制微生物的生长繁殖,中和内毒素活性等作用。LF与ALF结构差别示意图见图1。

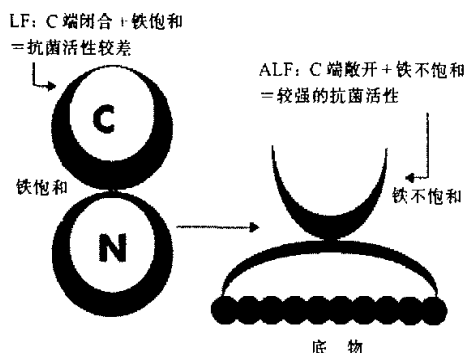


图1 LF与ALF结构差别示意图(来源: Naidu)

1.2 ALF的抗菌机理

LF的抗菌性能主要与其蛋白质的构象和环境条件有关(Naidu and Arnold,1997)。当LF结合到微生物细胞表面时其抑菌活性增强^[9]。尽管LF具有令人称奇的各种生理功能,但LF从乳中分离后有多种因素会影响其功能。蛋白质的分离条件会破坏或改变LF的分子结构,环境的PH,离子浓度和不适合的磷酸盐/碳酸盐浓度比会显著性降低LF的抗菌性能。所以,近年来人们都在关注ALF的研究,ALF的抗菌机理如下。

1.2.1 阻碍微生物的吸附

微生物吸附到上皮细胞粘膜或生物体表面是很多致病菌污染食品的第一步,微生物和生物体之间通过配体与受体相互作用或静电力、疏水作用、范德华力等作用有助于吸附或生长在生物体表面。肠道菌,尤其是*E.coli*在细胞表面长有多种菌毛,有利于其吸附或生长在生物体粘膜表面(Parry and Rooke,1985)。其它的几种通过食品传染的肠道致病菌在其细胞表面也都有类似菌毛的结构,有利于其吸附到寄主组织(胶原蛋白、纤连蛋白、粘蛋白)上。ALF能显著性改变微生物细胞的多种功能,能降低粘附素或菌毛的合成,中和*E.coli*的内毒素,起到阻碍微生物的吸附作用。

1.2.2 促进微生物的分离

大多数微生物主要吸附在生物体的胶原蛋白、纤连蛋白、粘蛋白上,ALF也能够吸附到这些组织上,而且比微生物有更强的亲和力,所以ALF通过竞争吸附起到阻止微生物的吸附作用。研究表明,低浓度的ALF就能起到促进粘附在生物体表面微生物(既包括活菌又包括死菌)的分离作用。

1.2.3 抑制微生物的生长

Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 两种价态的改变,对生物的活性起到重要的作用,如在生物能量的合成(包括通过磷酸化形成ATP)的过程中就起着重要的作用。这样铁离子的剥夺会阻止生物细胞的复制。在生物进化的过程中,相应的各种铁离子结合蛋白会从环境中去结合铁离子。所以LF从铁不饱和状态向铁饱和状态的转换是其重要的抗菌机制,其抗菌作用在其等电点处增强。由于ALF为LF的改良结构,N端固定,C端为敞开,为铁不饱和状态,所以较LF具有更强的抗菌性能。

实验表明,ALF还具有广谱抗病毒作用,包括DNA或RNA病毒,其与核酸作用与与真核细胞的结合是可能的抗病毒机理。进一步研究也表明,ALF喷洒在食品加工的设备上也能起到抑菌的作用。

1.3 LF与ALF的抑菌性能比较

ALF不仅具有LF所表现的抑制微生物的活性,而且比LF强得多。ALF抑制微生物的最小浓度也比LF低得多^[7]。与LF相比,ALF在富含铁的环境(肉类和生物体的体液)中具有更强的抑菌活性,此外,ALF还能与来自益生菌的细菌素,来自大肠杆菌的大肠杆菌素协同作用,共同抑制微生物的生长。

通过实验表明^[7],ALF抗*E.coli* O157:H7性能较LF高2.7个对数值;在TSB培养基上培养,通过在600nm处测吸光度表明,ALF抑菌的时间较LF长17.4h;在达到24h抑菌时间内,1%LF与1%ALF对接种量为 10^4 的*E.coli* O157:H7的最小抑菌浓度分别为大于1000 μ g/ml和62 μ g/ml。在每平方英寸的牛肉表面接种 10^4 的*E.coli* O157:H7,在室温下放置24h,然后喷洒1%的LF和1%的ALF,结果显示ALF比LF在阻止*E.coli*生长方面高2.5个对数值。在肉类加工正常的卫生处理过程中约有72.2%的*E.coli*被除去,而在同样的装置中加入ALF喷洒装置,在肉的表面喷洒浓度为1%的ALF 10s,则其除菌率达99.9%。

2 高效表达人乳铁蛋白(hLF)的转基因技术进展

目前应用的LF主要是从乳清中分离的天然蛋白,每公斤价格约为1000美元,成本较高。为了能更广泛地应用LF,必需获得廉价的重组蛋白,因此应得到高效表达重组LF的转基因生物,以满足市场需求,这是当前人们正在研究的课题。

2.1 通过哺乳动物的乳腺生产hLF

通过哺乳动物乳腺生产外源蛋白,具有成本低、分离纯化简单、产量高、不易受污染、也不污染环境、可持续生产、尤其是所表达的外源蛋白可进行翻译后加工,具有天然蛋白的结构

及活性等优点,因而日益成为生物反应器的研究热点^[8]。建立hLF乳腺生物反应器的基本方法为(以牛为例):首先分离hLF的人类基因编码,随后将其与乳腺特异性表达调节元件牛 α -SI酪蛋白基因相连接,用显微注射技术将构建好的载体DNA直接注射入牛受精卵的原核中,并将被注射的受精卵移入假孕母牛输卵管内继续发育,妊娠后出生的幼崽为转基因牛,在它们的泌乳期选择乳汁中表达有hLF的母牛,表达hLF量最高的母牛产下的第二代公牛,作为第三代转基因牛的父代,再进行繁殖得到转基因牛。Patrick H.C.^[9]等描述了用转基因牛的奶大规模生产重组人乳铁蛋白(rhLF)。在牛奶中生产浓度可达每升数克级的rhLF。人乳中天然的hLF和rhLF具有相同的结合与释放铁的特性。虽然天然hLF和rhLF经历了不同的N端糖基化,但它们在具有免疫活性和白细胞减少的小鼠的3种不同个体内感染模型中同样有效,而且显示了在一些感染位点的相似定位。这些结果表明了转基因牛在大规模生产hLF中的应用潜力。

曹阳等^[10]通过PCR法克隆了hLF基因cDNA,山羊 β -乳球蛋白基因5'端调控序列,连接后克隆到表达载体pLNCX中。利用脂质体包裹的方法将乳腺特异表达重组质粒导入到小鼠乳腺瘤细胞中,并在细胞中表达出具有活性的rhLF,从而为实现hLF基因的乳腺表达奠定了基础。他们得到的34kDa rhLF具有抑制大肠杆菌生长的作用,而且较hLF标准品抑菌作用还强。

2.2 通过转基因植物生产hLF

最近日本农水省生物资源研究所等单位开发出一种基因重组番茄。他们将人体乳腺中产生的hLF基因导入了番茄品种“秋玉”之中。实践表明,番茄“秋玉”的果实、叶、根的部分能生成hLF,在其果实中,每100g质量可生成2.5~3.3mg的hLF^[11]。张大兵^[12]报告了在烟草中表达了50kDa的rhLF,同样具有hLF活性,而且比hLF的杀菌作用还强。Daniel K.X.等^[13]报导了将完整的人的hLF基因导入马铃薯中,在马铃薯中得到表达的rhLF具有跟人乳中hLF同样的生物活性和抑菌性能。这为大规模应用hLF,开发母乳化婴儿食品奠定了基础。

2.3 过微生物生产hLF

Liang和Tom^[14]报告了hLF在啤酒酵母(*S.cerevisiae*)中的表达。通过克隆的cDNA置于酵母螯和素(chelatin)启动子的调控下,hLF成功地在酵母细胞中合成然后通过酵母转化酶分泌信号序列将rhLF分泌到细胞外,产率为1.5~2.0mg/L。Ward等^[15]报告了由乙醇可诱导酒精脱氢酶启动子控制的hLF在构巢曲霉(*A.nidulans*)中的表达,rhLF的生产水平为5mg/L,但只有30%的rhLF分泌到细胞外。此外,Connecly^[16]在米曲霉(*A.oryzae*)中克隆和表达了hLF。

总之,通过PCR扩增获得hLF基因,并将其在生物体内进行高效表达,开辟了一条更为简捷经济的获取hLF的途径,这为LF的研究和应用奠定了基础。

3 LF工业化生产途径的最新研究

自1960年以来,人们就试着采用各种方法来制备LF,如色谱法、超滤法、盐析法、固定化单克隆抗体法以及酸沉淀法等。从人乳或牛乳中分离纯化LF。其中,亲和色谱法和固定化单克隆抗体法能够产生出纯度很高的LF,一般运用于医药行业,而其价格昂贵,技术要求高,所以不适用于工业化生产。而超滤法因其操作简介,成本较低,易保留LF的生物活性,是实现工业化分离LF的合适方法。日本学者岛崎敬一^[17]于1989年提出用超滤法从干酪乳清中分离LF,该法通过反复浓缩处理,使产品蛋白质分子量介于 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 之间,LF回收率为69%,操作简单,费用较低,易于形成规模化生产,但LF纯度低,超滤膜需要经常清洗。Dubois^[18]采用超滤法,得到5倍浓缩倍数的LF和免疫球蛋白的截留物。卢蓉蓉等^[19]采用板式膜组件,以改良的醋酸纤维素(CA)膜为膜材料,选择错流的超滤方式,切向流速选用的最大体积流量4L/min。膜透压为0.15MPa,温度 t 为40~42℃为适宜的操作参数。获得LF粗品中LF质量分数为26%,纯度为29.8%。

凌雪萍等^[20]考虑到了工业化生产的需求,选用了有机溶剂和盐沉淀法,采用两次硫酸铵沉淀和一次乙醇沉淀分离纯化LF,最终纯度达到45%左右,相对于目前报道所用的离子交换层析和凝胶层析方法比较简单,易于操作,而且成本相对也低,适用于保健品和食品添加剂等纯度要求不高的行业。

4 发展趋势

4.1 ALF将在世界各国广泛应用

ALF对肉类表面易生长的30多种致病菌具有强烈的抑制作用^[7]。不仅能抑制通过食品传染的致病菌,包括:*E.coli* O₁₅₇H₇,*Listeria monocytogenes*,*Salmonella* spp.,*Campylobacter* spp.,*Aeromonas hydrophila*,and *Staphylococcus aureus*,以及一些酵母菌、霉菌、DNA和RNA病毒。而且还具有较强的抑制一些抗药性菌的作用,如对多种药抗性的*Salmonella* Typhimurium DT104,万古霉素抗性的*Enterococcus faecium*,以及青霉素抗性的*Staphylococcus aureus*。此外,ALF还具有抑制耐辐射菌的作用,如*Brochothrix thermospacta*,*Deinococcus radiopugnans*,*Deinococcus radiodurans*,*Methylobacterium radiotolerans*。当前人们正在研究把ALF添加到可食用的包装材料中和香肠的包装中,以及与其它防腐措施协同作用,会起到很好的抑菌效果。ALF已被美国FDA(食品和药品管理局)和美国农业部批准用于新鲜肉类防腐的辅助剂,将ALF喷洒到肉类胴体或分割肉表面,可以减少加工过程中微生物的污染,抑制微生物的生长,起到了延长肉类货架期的作用,已经应用到肉类工业的生产上。在欧盟、日本、韩国等ALF都被允许应用。

在人们对食品安全性日益关注的今天,这种天然、安全、高效的具有多种生理功能的抑菌剂必将在世界各国得到更加广泛的应用。

4.2 LF及乳铁素将实现工业化生产

随着LF的分子结构、氨基酸序列、等电点及功能区域的研究清楚,根据其分子量大小和带电性,采用超滤法和吸附法分离提纯LF在国内已通过中试,原料一次处理量达到300kg,有望在近期实现工业化生产。将LF酶解生成抗菌活性多肽—乳铁素的研究也取得了很大进展,工业化生产途径正在研究,有望开发出安全高效的天然防腐剂,广泛应用于食品、药品及化妆品领域^[21]。

4.3 LF的多种生物学功能将得到进一步的开发利用

随着LF的分离纯化技术的完善,生产成本的下降,LF应用也将更加广泛:在婴幼儿食品中添加LF,可增强免疫力、促进生长发育;在口香糖、化妆品、胶囊或饮料中添加LF,作为补铁制剂用来治疗和预防铁缺乏症,或用于治疗腹泻、STU症及增强抗炎症能力等;LF还可用于人乳腺炎等疾病的治疗;LF的抗氧化性可延长大豆油等油脂的保质期。此外,炎症发生时激活中性白细胞产生并释放LF,血液中的含量也随之增加,因此LF可作为免疫反应指标,也可作为中性白细胞动力学、粒细胞白血病、慢性髓样白血病、囊性纤维病变、关节炎等疾病诊断指标;LF抗体可以作为Felty's综合症诊断指标;LF还可应用于肺癌的诊断和分析^[22]。总之,随着研究的不断深入,LF的多种生物学功能将得到广泛应用。

参考文献:

- [1] 曹劲松. 初乳功能性食品[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2000.
- [2] Hiroyuki Tsuda, Kazunori Sekine, et al. Milk and dairy products in cancer prevention: focus on bovine lactoferrin[J]. Mutation Research, 2000, 462: 227-233.
- [3] Keiichi S Z. Lactoferrin: A marvelous protein in milk [J]. Animal Science Journal, 2000, 71(4): 329-347
- [4] Masanori Ikeda, Akito Nozaki, et al. Characterization of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultured cells[J]. Virus Research, 2000, 66: 51-63.
- [5] Naidu A.S. Immobilized lactoferrin antimicrobial agents and the use [P]. US Patent 6,172,040 B1, 2001.
- [6] Dalmastri C, Valenti P, et al. Enhanced antimicrobial activity of lactoferrin by binding to the bacterial surface [J]. Microbiological, 1998, 11: 225-230.
- [7] Naidu A, Satyanarayan. Activated lactoferrin a new approach to meat safety [J]. Food Technology, 2002, 56(3): 40-45.
- [8] 薛京伦, 卢大儒. 乳腺生物反应器的研究现状[J]. 生物技术通报, 1998, 3: 17-20.
- [9] Patrick H C, van Berkel, Mick M, Welling, et al. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows [J]. Transgenic Research, 2000, 9: 71-78.
- [10] 曹阳, 高华颖, 于黎, 等. 人乳铁蛋白基因克隆及细胞表达研究[J]. 遗传, 2002, 24(1): 9-14.
- [11] 凌雪萍, 庞广昌, 李国强. 乳铁蛋白的最新研究进展[J]. 食品科学, 2003, 24(1): 160-163.
- [12] 张大兵. 中国科学院上海植物生理研究所研究生毕业论文, 1998.
- [13] Daniel K X, Chong, William H R. Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants [J]. Transgenic Research, 2000, 9: 71-78.
- [14] Liang Q, Richardson T. Expression of human lactoferrin in *S. cerevisiae* [J]. Agric Food Chem, 1993, 41: 1800-1807.
- [15] Ward P P, May G S, et al. An inducible expression system for the production of human lactoferrin in *Aspergillus nidulans* [J]. Gene, 1992, 122: 219-223.
- [16] Conneely O M. PCT Patent, WO/93/22348.
- [17] 岛崎敬一, 黑田清隆. 限外滤过膜によるチズホエ中のタンパク質成分の分画について[J]. 酪农科学・食品の研究, 1989, 38(6): 95-102.
- [18] DUBOLS E. Process for separate from whey or from milk protein of high molecular mass such as immunoglobulins or lactoferrin [P]. 法国专利: FRP 2605322. 1988.
- [19] 卢蓉蓉, 许时婴, 王璋, 等. 预分离初乳中乳铁蛋白的超滤工艺[J]. 食品与生物技术, 2002, 21(1): 67-70.
- [20] 凌雪萍, 庞广昌, 李国强. 牛初乳中乳铁蛋白的分离及纯化[J]. 食品工业科技, 2002, 23(12): 40-41.
- [21] W. Bellarmy, M. Takase, H. Wakabayashi, et al. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1992, 73: 472-479.
- [22] 王崇道, 强亦忠. 乳铁蛋白的提纯及其放射免疫分析在肺癌诊断中的应用[J]. 同位素, 1999, 12(1): 5-8.

生物技术食品的安全性及其评价方法

郑大明

(山东省疾病预防控制中心, 山东 济南 250014)

摘 要: 生物技术食品是指利用基因工程技术将外源性基因转移至各种微生物、植物和动物体内, 或通过改变现

收稿日期: 2003-07-16

作者简介: 郑大明 (1976-), 女, 主管技师, 研究方向为食品微生物检验。