



乳铁蛋白及其在冷却肉保鲜中的应用

孔祥建, 杜庆, 郑海鹏

(西南大学食品科学学院, 重庆 400716)

摘要: 本文对乳铁蛋白的生理功能以及其在冷却肉保鲜中的应用进行了综述, 分析了存在的主要问题, 提出了研究的方向, 并对其发展前景进行了展望。

关键词: 乳铁蛋白; 生理功能; 冷却肉; 保鲜

Lactoferrin and Its Application in the Preservation of Chilled Meat

Kong Xiang-jian, Du Qing, Zheng Hai-peng

(Southwest University, Food Science College, Chongqing 400716)

Abstract: The physiological functions of Lactoferrin and its application in the preservation of chilled meat were summarized in this paper. We analyze the existing problem, put forward research orientation, and also viewed its prospect.

Key words: Lactoferrin; Physiological functions; Chilled meat; Preservation

中图分类号: TS202 文献标识码: B 文章编号: 1001-8123(2008)08-0049-05

冷却肉保质期长且柔软多汁, 色泽鲜红, 味道鲜美, 深受消费者的欢迎, 并且冷却肉的安全性、营养性均优于热鲜肉、冷冻肉, 因此已经成为生鲜肉发展的必然趋势。但由于肉类冷藏所采用的温度($0 \sim 4^{\circ}\text{C}$)并不能彻底抑制微生物的生长繁殖及其它有关变化的发生, 因此其保鲜期较短, 无法满足市场流通的要求。冷却肉保鲜方法的研究成为近年来的热点。

乳铁蛋白(Lactoferrin, LF)又称乳转铁蛋白, 是一种铁结合蛋白, 主要存在于母乳和牛乳中。最初由Sorensen等在动物乳中发现, 是一种非血红素铁结合性糖蛋白, 属转铁蛋白家族。Groves于1960年首次从牛乳中分离获得LF。乳铁蛋白是一种具有多种生物学功能的蛋白质, 不仅参与铁的转运, 而且具有杀菌、抗氧化、抗癌、调节免疫等多种功能^[1], 其中抑菌、抗氧化是其最主要的生理功能。LF对肉类表面易生长的多种腐败菌和致病菌具有强

烈的抑制作用。在美国, LF已被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, 将其喷洒到肉表面, 可以抑制微生物的生长, 起到了延长肉类货架期的作用^[1]。乳铁蛋白在冷却肉保鲜上的应用前景广阔, 成为开发和研究的热点。

1 乳铁蛋白的分布及含量

乳铁蛋白主要存在于哺乳动物乳清的球蛋白中, 占普通母乳蛋白质的20%。在乳汁, 尤其是初乳中LF的含量很高, 如在人的初乳中含量最高, 可达 7g/L , 随着乳汁的成熟会有所下降, 在一般乳中占 1g/L 左右; 牛乳中也含有LF, 但其含量比人乳中要少得多, 初乳中含量为 1g/L , 中期泌乳期仅为 0.1g/L ^[2]。人乳中的含量比其它哺乳动物要高得多, 但是在泌乳期间LF含量逐渐下降, 而牛在非哺乳期仍然保持较高的含量^[3]。如表1所示, LF

并非乳汁所特有，在哺乳动物的很多外分泌物中都存在，如泪、汗、唾液、精液等。目前，商业上使用的乳铁蛋白一般是从牛乳中提取的。

表1 人体组织分泌液中的LF含量

分泌液	LF含量 (mg/ml)	分泌液	LF含量 (mg/ml)
初乳	5~7	精液	0.4~0.9
乳汁	1~3.2	胰液	0.5
胃液	0.5~1.0	鼻分泌物	0.1
泪液	0.1~2.2	唾液	0.01~0.05

2 乳铁蛋白的功能和作用机理

2.1 广谱抗菌作用

Bullen 等人在1972年首先提出了LF的抑菌作用。LF属广谱抑菌剂，既能抑制需铁的G⁻菌，如大肠杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌等，也可抑制G⁺菌；但基本不抑制对铁需求不高的菌，如乳酸菌。另外，LF对链球菌的变异菌株和霍乱弧菌等有直接的致死效果，这种作用与铁无关。可见，LF对微生物的抑制作用并非只依赖于铁结合活性，还可通过直接作用达到抑菌杀菌效果^[4]。目前，LF的抑菌机理主要有以下几种观点：

(1) 铁剥夺 铁几乎是所有细菌生长的必需营养元素，LF是一种铁结合性蛋白，它可以与微生物竞争性地结合铁离子，使微生物失去赖以生存的铁离子，造成生长的铁缺乏环境，从而使微生物的生长受抑制，甚至死亡^[5]。Yamauchi等^[6]研究表明，脱铁乳铁蛋白才具有杀菌作用，而铁饱和乳铁蛋白的抗菌活性较低。

(2) 膜渗透 不依赖铁结合活性的LF杀菌机理在于LF和细菌表面的直接结合。Shimazaki等^[7]研究表明，乳铁蛋白活性多肽对病原菌的致死作用与抗生素的亲膜特性相似，体现为带正电荷的乳铁蛋白活性多肽与病原菌表面带负电荷的磷脂和脂多糖结合，从而增强了细胞膜的通透性，使细菌的脂多糖从外膜渗出，导致细胞膜的生理功能彻底破坏，达到对微生物的致死作用。

(3) 水解抗菌肽 研究表明，LF可通过水解得到的抗菌肽来实现其抗菌作用^[8]。LF经蛋白酶水解后，得到一些低分子量肽的抗菌活性大幅度增强，可抑制G⁺和G⁻菌生长，其中还包括一些对LF具有抗性的菌株。

(4) 抑制半胱氨酸蛋白酶 Ohashi等^[9]研究发现，LF对半胱氨酸蛋白酶有强烈的抑制作用。LF在10⁻⁶mol水平下可完全抑制木瓜蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶L，在10⁻⁴mol时可抑制半胱氨酸蛋白酶

B和S，但蛋白酶C除外。因此，LF对细菌的抑制作用可能是抑制了细菌的半胱氨酸蛋白酶。

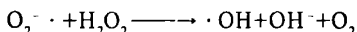
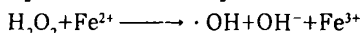
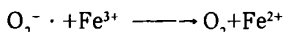
LF从乳中分离后的抗菌活性受到很多因素的影响。分离条件会破坏或改变LF的分子结构，pH值，离子浓度和不适当的磷酸盐/碳酸盐浓度比会显著性地降低LF的抗菌性能。碳酸盐可明显增加LF的抑菌作用，而柠檬酸盐会减弱其抑菌效果，这是两者竞争Fe³⁺的结果。LF的抑菌效果与pH值密切相关，在pH值为7.4时效果明显优于pH值为6.8的时候，pH值小于6时基本没有抑菌作用^[10]。Naidu^[11]研究发现，LF的抗菌性能主要与其蛋白质的构象和外界环境条件有关，当LF结合到微生物细胞表面时其抑菌活性增强。

照日格图等^[12]采用试管二倍稀释法测定了双峰乳中LF的抗菌活性，结果表明，LF对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌均表现出一定的抗菌活性，最小抑菌浓度(MIC)分别为3mg/mL和2mg/mL。并且LF的抗菌活性受盐类浓度、铁饱和度、温度和pH等多种因素的影响。当pH在7.5~8.0时LF的抑菌效果最好。杨严俊等^[13]同样也进行了LF的抑菌实验。经处理8h后，稀释平板计数表明，浓度为3mg/mL的LF对致病性大肠杆菌的抑菌率达到了97%，对沙门氏菌抑菌率达到95%，但对蜡状芽胞杆菌无抑菌作用。

2.2 抗氧化作用

由Haber-weiss反应式可以看出，游离的Fe³⁺和氧结合有很强的催化自由基反应能力，可产生活性很强的·OH和其它氧化剂。由于非铁饱和的LF具有结合Fe³⁺能力，因此其具有抗氧化功能。其作用机理是LF抑制了由铁引起的脂质氧化作用中所产生的硫代巴比妥酸和丙二醛的生成，阻断氧自由基的形成。此外LF可降低吞噬细胞羟自由基产生的可能性，抑制了单核细胞膜铁催化自动氧化反应。因此，可认为LF的抗氧化机制主要是结合了易引起氧化的Fe³⁺。有报道，在pH值为7.4的NaCl溶液中，饱和度为20%的LF和转铁蛋白抑制了牛脑磷脂脂质体的抗坏血酸铁盐催化的磷脂过氧化反应。

Haber-weiss反应式为：



2.3 抗病毒作用

乳铁蛋白在宿主体内对抵抗病毒有很大作用，对单纯疱疹病毒(HSV)、丙肝病毒(HCV)、人免疫

缺陷性病毒(HIV)、猫科动物免疫缺陷性病毒(FIV)及人巨细胞病毒(HCMV)有很强的抑制作用。另外,LF还可以抑制、杀死多种真菌。

Beljaars等^[14]研究了LF对巨化病毒的抑制作用,提出其作用机理主要是阻碍病毒入侵通道,而非通过调节免疫系统。而Waarts等^[15]研究发现,LF对病毒的抑制机制主要是干预病毒与受体的结合,并非影响其入侵通道或者影响其复制过程。关于LF抑制病毒的作用机制尚不清楚,可能为LF与细胞表面的病毒颗粒受体如糖胺多糖、低密度脂蛋白受体结合,或直接与病毒颗粒结合,干扰病毒在细胞表面的附着。

2.4 其它生理功能

2.4.1 促进铁吸收

LF和转铁蛋白具有相类似的转运铁的功能。它有助于人体对铁的吸收。这是因为LF通过它的氨基和羧基末端两个铁结合区域能高亲和的、可逆的与铁结合,并在一个较广的pH值范围内,维持铁元素完成在十二指肠细胞中的吸收和利用。实验发现,细胞对铁的吸收有负反馈调节机制。当LF到达肠道后,即和细胞表面的LF受体(LFR)起反应,然后LFR进入细胞内部,释放出 Fe^{3+} 。当细胞内缺铁时细胞表面的LFR增多,增加LF与其受体的结合。

2.4.2 机体免疫调节

Progemt等研究发现,乳铁蛋白能够与免疫细胞表面的受体结合,发挥其免疫调节功能,同时还能调节机体细胞因子的水平。LF具有调节巨噬细胞活性和刺激淋巴细胞合成的能力,可以防止细胞膜免疫失控的发生;嗜中性粒细胞是目前发现的含LF最多的细胞,当机体受感染时,它会释放出6~20倍以上的LF,夺取致病菌的铁离子使其死亡;LF还具有促进中性白细胞对受伤部分的吸附和聚集、增加粒细胞粘性、促进细胞间相互作用、调节免疫球蛋白分泌、参与调节机体免疫耐受能力、抑制补体系统激活或激活已有的补体途径等功能^[3]。

3 安全性评价

乳铁蛋白主要是从牛初乳中提取的一种天然物质,它被认为是一种安全物质,服用后无任何不良作用,安全可靠。用来作为食品成分或食品添加剂已在许多国家和地区得到法律承认。其主要特点如下:

(1) LF不含有稀有的氨基酸和外源化学成分,

是一种健康安全产品;

(2) LF在消化道中具有良好稳定性,同时具有免疫原性小、水溶性好、广谱杀菌等优点,并且能耐受胃肠道中蛋白酶及肽酶的降解。Kuwata等研究指出,LF在消化道中经酶解后其活性片段没有受到破坏;

(3) LF还具有良好的热稳定性,特别是在酸性条件下,加热甚至是高温高压处理对其抗菌活性没有影响。研究表明,脱铁LF在pH值为2.0~3.0,温度100~200℃下处理5min时发生明显降解,然而其抗菌活性却有所增强,表明降解以后得到的乳铁蛋白肽(Lfcin)的抗菌活性比LF本身还要高^[16]。

4 在冷却肉保鲜中的应用

4.1 抑菌作用

乳铁蛋白是一种具有多种生物学功能的蛋白质,是一种纯天然物质,具有多种生理功能,其中抑菌、抗氧化是其最主要的功能。Naidu等^[17]研究发现活性乳铁蛋白(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。不仅可以抑制致病菌以及一些酵母菌、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,如对多种药有抗性的*Salmonella typhimurium* DT104,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*。美国FDA和农业部批准LF用于新鲜肉类防腐的辅助剂。在欧盟、日本、韩国等LF都被允许应用。如表2所示为乳铁蛋白对冷却肉中常见腐败菌的最低抑菌浓度。

表2 乳铁蛋白对冷却肉中常见腐败菌的最低抑菌浓度(MIC)

常见腐败菌	假单胞菌	大肠杆菌	葡萄球菌	乳酸菌	热死环丝菌
最低抑菌浓度 MIC (mg/ml)	12.0	2.0	1.6	—	2.3

目前,国内外有关于LF用于冷却肉保鲜的可行性研究已有报道。美国加州职业技术大学的科学家们在试验中将少量的乳铁蛋白加入受大肠杆菌污染的肉中,结果LF对有害病菌产生了抑制作用,阻碍了病菌侵蚀肉的表层。这一实验提供了一种在不影响肉的口感、色泽和风味的前提下而杀灭病菌的安全的方法。该大学抗病菌研究中心主任Naidu博士说,保证肉品质量所需的ALF的数量仅为一杯牛奶中LF含量的几千分之一。

我国对LF的开发研究几乎是空白,应大力加强这方面的研究。付丽^[18]进行了乳铁蛋白的抑菌作

用及其对冷却肉保鲜和护色效果的研究,通过实验确定了LF抗氧化有效的用量范围:1~5mg/ml。在LF对冷却肉保鲜的单因素试验中表明,LF在3mg/ml时有一定的保鲜效果,随LF浓度的增加保鲜效果增强。LF对荧光假单胞菌、大肠杆菌、微球菌和金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度分别为12mg/ml,3mg/ml,2mg/ml,2mg/ml,pH7.5时LF的抑菌效果最好。

4.2 抗氧化与护色作用

冷却肉在贮存、销售期间,由于各种外界环境因素的影响,常发生表面变色现象,严重影响了肉的外观可接受性,也致使肉类生产行业遭受很大损失。在正常流通时,肌红蛋白(Mb)很快和O₂结合成消费者所喜爱的鲜亮红色的氧合肌红蛋白(MbO₂),而在贮藏和销售过程中,Mb球蛋白会发生部分变性,失去保护血红素的生理功能,血红素辅基中Fe²⁺会逐渐氧化成Fe³⁺。Mb被氧化成高铁肌红蛋白(metMb)后不再具备结合氧气的的能力,肉色改变,当metMb达到70%时,肉就变成褐色。

Bekhit^[19]综合前人的实验结论后提出,抗氧化剂能很好地保护肉色,其原因可能是因为它能保护好高铁肌红蛋白还原系统。研究证明,抗氧化剂可降低氧合肌红蛋白的氧化速度,同时促进metMb向MbO₂转变。LF能抑制铁诱导的脂质过氧化过程所产生的硫代巴比妥酸和丙二醛的生成,具有很好的抗氧化作用。在冷却肉表面喷涂一定浓度的LF则可以有效防止变色现象的发生。

付丽等^[20]研究了乳铁蛋白对冷却猪肉的护色效果,结果表明,将LF涂于肉的表面可使鲜肉颜色亮红,肉质鲜嫩,大大提高了鲜肉的感官效果。浓度在2mg/ml时具有较强的抗氧化作用,第21d时,TBARS值为0.56mg/100g。并且随着浓度的增加效果增强。另外,LF与VC、VE三者具有很强的协同抗氧化作用,可使肉块在第21d时仍呈现良好的色泽。

5 存在问题及研究方向

5.1 存在问题

乳铁蛋白作为一种纯天然的物质,具有多种生物学功能,有很大的开发应用前景。但同时也存在以下问题。首先,开发LF遇到的最大问题是制造成本太高,难以实现商品化。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,价格昂贵,无法在实际中广泛应用;另

外,与传统抗生素相比LF抗菌活性还不够理想,单一LF溶液对G⁻菌的抑制效果不明显,在3mg/ml时对冷却肉保鲜具有一定效果,随浓度增大效果增强,但浓度达到6mg/ml时,对细菌总数和假单胞菌的抑制作用也不大,而假单胞菌却是冷却肉中的优势菌^[18]。

5.2 研究方向

结合以上所存在的问题,我们应当从以下方面做重点的研究:

(1)研究新技术,降低生产成本,实现工业化生产。我国生产乳铁蛋白的原料(初乳)廉价、丰富,有生产利用乳铁蛋白的基础,色谱法和超滤法的更为深入的研究,可望实现乳铁蛋白的工业化生产。另外,采用重组技术生产,利用动物乳腺反应器生产LF应该是一个方向,但此项技术目前还处于实验室研究阶段,目的基因在宿主染色体的整合问题,目的蛋白的翻译后修饰问题及安全问题等等都还要尚待解决^[21];

(2)分离活性多肽。由LF酶解得到的靠近乳铁蛋白N-端的乳铁蛋白肽(Lfcin),具有比LF强400多倍的抗菌活性,并具备LF的所有生物学活性,且性质更加稳定。浓度为10μg/ml左右的Lfcin就能抑制G⁻菌的生长,除个别G⁺菌之外Lfcin也能在较低浓度下抑制它们的生长,对真菌也相似^[22]。这将成为以后开发和研究的热点;

(3)与其它防腐剂协同作用的研究。假单胞菌是冷却肉中的优势菌,但是,单一乳铁蛋白溶液对细菌总数和假单胞菌抑制效果不明显,将溶菌酶、Nisin与乳铁蛋白协同抑菌效果很好,李娜等^[23]研究表明,乳铁蛋白和Nisin结合使用,其抗菌活性增强。

6 展望

由于乳铁蛋白具有诸多神奇的生理功能,近年来,乳铁蛋白的开发研究已引起国际广泛关注,1992年以来有关乳铁蛋白的国际研讨会已召开多次,但我国在这方面的研究还处于起步阶段。但是,随着新技术的研究和应用,生产成本的降低,有望开发出安全高效的天然防霉剂和抗氧化剂,应用于冷却肉的防腐保鲜。随着冷却肉日益成为肉类消费的主流,这种天然、安全、高效的具有多种生理功能的活性物质必将在肉制品行业中得到更加广泛的应用。

参考文献

- [1] Brock J H. The physiology of lactoferrin, *Biochem [J]. Cell Biol*, 2002, 80:1-6.
- [2] 曹劲松. 初乳功能性食品[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000.
- [3] 曹阳包, 永明, 安利佳. 乳铁蛋白研究现状. *食品科学*, 2002, 23(12): 132-138.
- [4] Farnaud S, Evans R W. Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties [J]. *Mol Immunol*, 2003, 40(7): 395-405.
- [5] Oppenheimer J S. Iron and its relation to immunity and infectious disease [J]. *J Nutr*, 2001, 131: 6165-6335.
- [6] Yamauchi K, Tomita M, Giehl T J, et al. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin derived lactoferrin peptide fragment [J]. *Infect Immun*, 1993, 61: 719-728.
- [7] Shimazaki K I, Tsuda H, Tomita M. Lactoferrin: structure, function and applications [A]. *Experta Medica International Congress Series [C]*. Amsterdam: Elsevier, 1998. 1195.
- [8] DIONYSIUSDA, MILNE JM. Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: Purification and characterization[J]. *J Dairy Sci*, 1997, 80: 667-674.
- [9] Ohashi A, Murata E, Yamamoto K, et al. New functions of lactoferrin and β - casein in mammalian milk as cysteine protease inhibitors [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 306: 98-103.
- [10] 张东送, 庞广昌, 谷芳, 等. 乳铁素 B 的抗菌活性及其影响因素[J]. *食品与生物技术学报*, 2005, 24(2): 1-5.
- [11] Naidu A.S. Immobilized lactoferrin antimicrobial agents and the use [P]. U S Patent 6,172,040 B1, 2001.
- [12] 照日格图, 包宏杰, 哈斯苏荣. 双峰驼乳中乳铁蛋白的体外抗菌活性及影响因素. *动物医学进展*, 2007, 28(10): 22-26.
- [13] 杨严俊, 张亚辉, 周培江. 几种免疫活性蛋白抑菌活性的测定. *食品工业科技*, 2003, 7: 24-25.
- [14] Beljaars L, Wiegman F C, Harmsen M C, et al. Inhibition of cytomegalovirus infection by lactoferrin in vitro and in vivo [J]. *Antiviral Res*, 2004, 63(3): 197-208.
- [15] Waarts B L, Wilschut J, Aneke O J, et al. Antiviral activity of human lactoferrin: Inhibition of alphavirus interaction with heparin sulfate [J]. *Virology*, 2005, 333(2): 284-292.
- [16] 凌雪萍, 庞广昌, 邢伟. 乳铁蛋白的开发利用及其研究进展[J]. *中国乳品工业*, 2002, 30(4): 23-26.
- [17] Naidu A, Satyanarayan. Activated lactoferrin a new approach to meat safety[J]. *Food Technology*, 2002, 56(3): 40-45.
- [18] 付丽. 乳铁蛋白的抑菌作用及其对冷却肉保鲜和护色效果的研究[D]. 东北农业大学, 2006.
- [19] Bekhit A. E. D., Geesink G. H., Ilian M. A. et al. The effect of natural antioxidants on oxidative processes and metmyoglobin reducing activity in beef patties. *Food Chemistry*, 2003, 81: 175-187.
- [20] 付丽, 赵玮, 孔保华. 乳铁蛋白对冷却猪肉的护色效果. *肉类工业*, 2006, 303(7): 25-27.
- [21] 陈丰生, 袁勤生. 乳铁蛋白的研究进展. *食品与药品*, 2008, 10(1): 62-66.
- [22] 唐传核, 曹劲松, 彭志英. 乳铁蛋白最新研究进展. *中国乳品工业*, 2000, 28(5): 44-47.
- [23] 李娜, 胡志和, 庞广昌, 仇菊. 常用防腐剂对牛乳铁蛋白抗菌活性的影响. *食品科学*, 2006, 27(12): 134-137.