

高活性的生物制剂——乳铁蛋白

郭本恒 东北农学院食品系 150030

摘 要 综述了婴儿奶粉的重要添加剂, 高效补铁剂及具有其它重要生物功能的乳铁蛋白的有关问题, 对其性质、分离方法和生物活性作了详细地介绍, 为乳铁蛋白的研究及开发利用提出建设性意见并提供帮助。

关键词 乳铁蛋白 生物活性

人乳和其它动物乳在成份上的主要差别在于乳铁蛋白和溶菌酶的不同, 乳铁蛋白、溶菌酶在人乳中的含量分别是牛常乳的 140、400 倍^[1]。为使婴儿奶粉的研究有所突破, 不只是在乳的成份上如改变蛋白质、脂肪、乳糖、维生素和矿物质的比例使其接近人乳, 更应考虑添加乳铁蛋白和溶菌酶, 使其在生物活性、生理上接近人乳; 此外乳铁蛋白还有补铁、抑菌等多种生物效应, 可作为一种高效生物制剂单独开发利用。

1 乳铁蛋白的基本性质

乳铁蛋白是一种铁结合糖蛋白, 是一个分子结合两个原子的铁, 只有很少一部分被饱和, 分子量 81800, 结合的糖类一般为甘露糖、N-2 胺葡萄糖胺, 墨角藻糖和唾液酸等^[1,2], 牛乳铁蛋白的等电点在 pH=8, 人乳约为 6, 其结构为“二枚银杏叶型”^[3]。它和乳中的转铁蛋白密切相关, 而转铁蛋白被确认和血液中的转铁蛋白相同, 只有乳铁蛋白被认为是乳特有蛋白。

表 1 牛、人乳中乳铁蛋白的含量

人 乳		牛 乳			
初乳	常乳	初乳	常乳	复杂 乳腺 早期 1~8 中期 20~30	乳房干酪 炎乳乳清 1~8 0.06
6—8	2—4	~1	0.02~0.35		

迄今已确认在下列动物乳中含有乳铁蛋白: 人、马、牛、山羊、猪、兔、豚鼠等^[4], 在

人乳及其它动物初乳中含量较高, 一般除人乳外所有动物的常乳含量均很低 (见表 1)^[5]。乳铁蛋白的提取必须利用牛的初乳或乳房炎乳, 它们一般被废弃, 故原料来源充足且价格低廉。

2 分离及鉴定

虽在多种乳中均含有乳铁蛋白, 但只有 4 种乳—人、猪、牛、羊乳的乳铁蛋白被分离出来, 都是在实验室规模上且改进方法很少。一般的分离方法包括蛋白质的盐析, 酪蛋白的酸沉淀除去, 渗析和离子交换色谱分离, 得到的产品纯度较高, 但产量较低^[4]。BLÄCKBERG 等研究了从人乳中一步分离乳铁蛋白的方法^[6], 他是在 Sepharose 上实现分离的。最近在固定化的抗体上分离人、牛乳铁蛋白有所发展, 但由于成本高而没有大规模应用^[7]。Buchta 在 Baer 研究的基础上, 改进了羊乳的分离方法并得到了很好的结果^[5,8], 他们的分离方法如下:

初乳 (550 ml) $\xrightarrow{\text{在 } 4^{\circ}\text{C}, 4000 \text{ g 离心 } 60 \text{ min}}$ 脱脂乳
 $\xrightarrow[\text{pH}=7]{\text{用 } \text{KHCO}_3 \text{ 调整}}$ $\xrightarrow[\text{8 mg/ml}]{\text{硫酸亚铁铵}}$ $\xrightarrow[\text{室温 混合 } 2 \text{ h}]{\text{6 g CM-sephadex}}$
 $\xrightarrow[\text{去上清液}]{\text{4}^{\circ}\text{C 置过夜}}$ $\xrightarrow{\text{树脂装入漏斗}}$ $\xrightarrow{\text{2L 去离子水洗}}$
 $\xrightarrow[\text{pH}=7.2]{\text{2L } 0.02 \text{ M Na}_3\text{PO}_4 \text{ 洗}}$ $\xrightarrow[\text{内含 } 0.15 \text{ M NaCl}]{\text{1L } 0.02 \text{ M Na}_3\text{PO}_4 \text{ 洗}}$
 树脂装柱 (2×40 cm) $\xrightarrow[\text{NaCl (0.15 M~1 M)}]{\text{1L } 0.02 \text{ M Na}_3\text{PO}_4 \text{ 流速 } 20 \text{ ml/h}}$
 收集

日本学者岛崎敬一利用一元平板免疫扩散法提出乳铁蛋白的分离方法^[9], 超滤技术得到

良好的应用。

乳铁蛋白的鉴定利用 SDS-PAGE 电泳法和高压液相色谱 (HPLC)^[5], 乳铁蛋白的含量以牛血清蛋白为标准, 通过穿透 BCA 蛋白质实验法测定。

3 乳铁蛋白的生物功能

乳铁蛋白在动物初乳中含量高, 随后有迅速的下降, 牦猪的初乳 $>1\text{ mg/ml}$, 14 天后下降 $<200\text{ }\mu\text{g/ml}$, 羊的初乳 $>500\text{ }\mu\text{g/ml}$, 几天后下降为 $<100\text{ }\mu\text{g/ml}$, 使人联想到初乳的免疫重要性。虽然在母乳中铁的含量只有 $(0.3\sim0.5\text{ }\mu\text{g/ml})$ ^[10], 在 4~6 月内, 婴儿并没有缺铁的问题, 说明铁的吸收率很高, 研究表明乳铁蛋白中的铁吸收率达 $50\%\sim75\%$, 提高其利用率 5~7 倍。由于铁的饱和度在 $2\%\sim4\%$ 水平, 使得一些需铁微生物的繁殖受到抑制, 故乳铁蛋白有抑菌作用, 对埃希氏大肠杆菌, 假单胞菌、假丝酵母等有抑制作用。现总结它的生物活性如下^[9]:

(1) 对铁在肠中的吸收、还原溶菌酶再生有刺激作用。

(2) 对髓细胞, 吞噬细胞, NK 和 ADCC 活性, 炎症反应有调整作用。

(3) 抑菌作用, 对某些病原菌有很强的作用, 还有很多微生物方面的工作需要它才能完成。

4 乳铁蛋白的开发利用及展望

乳铁蛋白自 60 年代发现以来, 人们虽进行了一些研究, 但真正进入了它的应用时期是在 80 年代后期, 起步较晚, 亟待解决的问题和开发的领域很多, 有许多的研究只是初步结论, 有些甚至是猜测和间接结果, 因此提出下列建设性意见供参考。

(1) 在分离方法有所突破, 主要是要简化分离步骤、提高产率, 特别是要降低分离成本, 以期实现工业化生产。可否参照乳的其它蛋白质的分离最新方法, 在得到的蛋白质混合物的提纯上下功夫。

(2) 对乳铁蛋白的基础研究应该加强, 对于它的抑菌作用, 应选择更多的菌种进行实验, 弄清它对人体在微生物方面的调整作用, 以期对它的生物活性有更清楚认识。

(3) 对于它的结构、结合能和铁饱和度等基本性质方面的问题, 应采用一些新的测试方法, 如用 XRD、XRS、原子吸收等, 拓宽研究领域及方法, 把诸多的化学方法纳入乳品研究。

若以每头乳牛初乳量 10 kg , 乳牛数以 200 万头 (1988 年数值) 计算, 初乳量达 2 万 t , 以 4 g/kg 乳铁蛋白计算, 其总量达 80 t , 作为一种高效生物剂的重要的婴儿奶粉添加剂其利用价值是相当可观的, 况且羊乳及其它动物乳的利用还未加以考虑。

参考文献

- 1 (日) 岛崎敬一. comparison of struction and iron binding capacity of Lactoferrin Obtained from colostrum and Cheese whey. 酪农科学, 食品の研究, 1988, 37: A137.
- 2 河野信贵等. 第 81 回日本畜产学会大会讲演要旨 1989.
- 3 Trends Biochem Sci, 1987, 12: 350.
- 4 Masson P. L. et al. Studies on lactoferrin, the ironbinding protein of secretions. Protides of the Biological Fluids, 1966, 14: 115.
- 5 Buchta R. et al. Ovine lactoferrin. isolation from cdostrum and characterization J. Dairy Res, 1991, 58: 211.
- 6 Bläckerg, L. et al. Isolation of lactoferrin from human whey by a single chromatographic step. FEBS, 1980, 109: 180.
- 7 Kawakarni, H. et al. One—step isolaoion of lactoferrin using immobilized mondonal antibodies J. Dairy Sci. 1987, 70: 752.
- 8 Baer, A. et al. Isolation and partial characterization of ovine Lactoferrin, Experientia, 1979, 35: 1554.
- 9 岛崎敬一. Separation and Utilization of bovine Lactoferrin. 酪农科学, 食品の研究, 1989, 38: A277.
- 10 Bulle, J. J. et al. Irom—binding proteins in milk and resistance to escherichia coli infection in infants. Brit. Med. J. 1972, 1: 69