



肉类保藏技术(十三)

Meats Preservation()

生物防腐剂在肉品保鲜中的应用(二)

——溶菌酶和乳铁蛋白

刁静静

(黑龙江省农产品加工工程技术研究中心, 大庆 163319)

摘要: 溶菌酶和乳铁蛋白(LF)属于生物防腐保鲜剂的范畴。溶菌酶由于其来源不同其结构也不同,其具有抗菌消炎、抗病毒、增强免疫力、促进双歧杆菌增殖等作用,乳铁蛋白则是一种结合糖蛋白,具有抑制细菌生长的特性。本文分别介绍了溶菌酶和乳铁蛋白的结构及其生物学特性,并介绍了他们的抑菌特性。并详细阐述了溶菌酶和乳铁蛋白在肉及肉制品中防腐保鲜方面的研究进展。

关键词: 溶菌酶; 乳铁蛋白; 保鲜; 肉制品

Application of biologic preservative agent in meat products —— Lysozyme and Lactoferrin

Diao Jingjing

(Agri-Food processing Development centre of Heilongjiang, Daqing, 163319, China)

Abstract: Lysozyme and Lactoferrin (LF) belonged to biologic preservation. Lysozyme possessed different structure because of its different sources. Lysozyme possessed antibacterial, enhanced immunity and made bacillus bifidus proliferated. Lactoferrin (LF), an iron-binding glycoprotein, could inhibit bacteria. The paper described structure and biological characteristics of lysozyme and lactoferrin, mechanism of bacteriostasis, it explained the research progress of lysozyme and lactoferrin as preservative agents in meat products.

Key words: lysozyme; lactoferrin; preservation; meat products

中图分类号: TS202 文献标识码: A 文章编号: 1001-8123(2009)04-0053-09

一、溶菌酶

溶菌酶(别名球蛋白G1, Lysozyme, EC3.2.1.17), 其化学名称为N-乙酰胞壁质聚糖水解酶, 又称胞壁质酶, 是一种有效的抗菌剂, 能切断肽聚糖中N-乙酰葡萄糖胺和N-乙酰胞壁酸之间的 β -1, 4糖苷键之间的联结, 破坏肽聚糖支架, 在内部渗透压的作用下细胞胀裂开, 引起细菌裂解^[1, 2]。溶菌酶广泛地分布于自然界中, 在人的组织及分泌物中可以找到, 动物组织中也有, 以鸡蛋清中含

量最多, 其他植物组织及微生物细胞中也存在^[3]。溶菌酶根据其作用的微生物不同, 可分为两大类: 细菌细胞壁溶菌酶和真菌细胞壁溶菌酶。细菌细胞壁溶菌酶可分为两种, 一种是作用于 β -1, 4糖苷键的细胞壁溶解酶, 另一种是作用于肽链“尾”端和酰胺部分的细胞壁溶解酶。真菌细胞壁溶菌酶包括酵母菌细胞壁溶菌酶和霉菌细胞壁溶菌酶^[4]。

防腐剂是食品工业中不可缺少的一种添加剂,

收稿日期: 2009-02-12

作者简介: 刁静静(1981-), 女, 硕士, 研究方向肉品科学。Email: diaojing-jing@163.com

为了抑制食品的腐化变质最直接的方法就是在食品加工过程中添加适量的防腐剂,然而随着社会经济的的发展和人们生活水平的提高,人们对食品的安全性要求越来越高,寻求广谱、高效、低毒、天然的食品保鲜剂是目前食品科学研究中的热点之一,溶菌酶是一种无毒、无害、安全性很高的高盐基蛋白质,所以将其作为一种天然防腐剂添加在食品工业中将会有广阔的应用价值。

1 溶菌酶的结构、种类与性质

溶菌酶是采用生物工程技术进行克隆、提取而制取的一种天然酶,安全绿色的添加剂,无抗药性。溶菌酶是一种葡萄糖苷酶,化学性质稳定,干燥条件下在室温可长期保存,其纯品为白色或微黄色晶体或无定型粉末,无嗅,味甜,易溶于水,不溶于丙酮、乙醚。Philips 等人用X射线晶体结构分析法分析了溶菌酶的三维结构,溶菌酶分子接近椭圆形,而且构象复杂, α 螺旋仅占25%,在分子的一些区域有伸展着的 β 片层结构,研究表明溶菌酶的内部几乎都为非极性的,疏水的相互作用在溶菌酶的折叠构象中起到重要作用,其分子表面有一个容纳多糖底物6个单糖的裂隙,这是溶菌酶的活性位点。结构式如下:

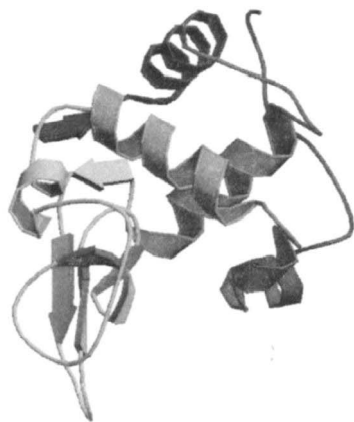


图1 溶菌酶的分子结构图
溶菌酶广泛存在于人体多种组织中,鸟类

和家禽的蛋清、哺乳动物的泪、唾液、血浆、尿、乳汁等体液以及微生物中也含有此酶,其中以蛋清含量最为丰富。而且不同来源的溶菌酶其结构特点不同。鸡蛋清溶菌酶占蛋清总蛋白的3.4% - 3.5%,作为溶菌酶类的典型代表,是目前重点研究的对象,也是了解最清楚的溶菌酶之一。它由18种129个氨基酸残基组成,具有4个S-S键,分子量为14000,等电点为11.1,最适温度为50℃,最适pH值为6-7,其化学性质非常稳定,在pH1.2-11.3范围内剧烈变化时,结构仍稳定不变。遇热也很稳定,在pH4-7、100℃处理1min不失活,是一种稳定的碱性蛋白质,但在碱性条件下对热稳定性较差。人及哺乳动物的溶菌酶则由130个氨基酸残基组成,有4个s-s键,分子量为14600,其溶菌酶活性比鸡蛋清溶菌酶高3倍。植物溶菌酶的分子量较大,约为24000-29100,植物溶菌酶对溶壁小球菌的溶菌活性不超过鸡蛋清溶菌酶的1/3,但对胶体状甲壳质的分解活性则是鸡蛋清溶菌酶的10倍。微生物产生的溶菌酶则分为7类:内N-乙酰己糖胺酶,此酶同于鸡蛋清溶菌酶,破坏细菌细胞壁肽聚糖中的 β -1,4糖苷键;酰胺酶,切断细菌细胞壁肽聚糖中NAM与肽“尾”之间的N-乙酰胞壁酸-L-丙氨酸键;内切酶,使肽“尾”及肽“桥”内的肽键断裂; β -1,3- β -1,6葡聚糖酶和甘露聚糖酶,此酶分解酵母细胞的细胞壁;壳多糖酶,与葡聚糖酶共同作用,可分解霉菌和酵母;磷酸甘露糖酶,与甘露糖酶共同作用,可分解原生质;脱乙酰壳多糖酶,主要分解毛霉和根霉。噬菌体产生的溶菌酶则是一种特异性的酶,由噬菌体感染、诱导产生,但在未被感染的宿主细胞上不存在该酶。

2 溶菌酶的作用及其抑菌机理

2.1 抗菌消炎以及抗病毒

溶菌酶是一种碱性水解酶,此类粘多糖是细菌细胞壁的主要成分之一,该酶能催化水解细胞壁中的N-乙酰胞壁酸和N-乙酰氨基葡萄糖之间的 β -1,4糖苷键,使细胞壁不溶性多糖分解成可溶性肽,细菌内容物溢出而使细胞壁溶解。溶菌酶能直接水解革兰氏阳性菌,在分泌型免疫球蛋白A、补体的参与下,还能水解革兰氏阴性菌如大肠杆菌等。此外,它还可与各种诱发炎症的酸性物质结合,使其组织基质的粘多糖代谢,从而达到消炎、修复组织的目的。梁爱华^[5]研究不同温度下鸡蛋清溶菌酶与 β -内酰胺类抗生素联合应用对大肠埃

希氏菌的生长及内毒素释放的影响,结果表明,在不同培养温度下,氨苄西林或头孢噻肟 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 均可导致细菌溶解,并诱导 *Escherichia coli* 释放大量的内毒素到培养基上清液中,这些培养基上清液在体外培养的巨噬细胞上可诱导大量的肿瘤坏死因子($\text{TNF-}\alpha$)和白细胞介素6(IL-6)产生。而鸡蛋清溶菌酶与 β -内酰胺类抗生素联合使用能阻止细菌溶解,降低细菌内毒素的释放,并减少巨噬细胞 TNF- 和 IL-6 的产生。

溶菌酶能与带负电荷的病毒蛋白直接作用,与DNA、RNA、脱辅基蛋白形成复盐,使病毒失活。该酶也可以预防和治疗病毒性肝炎,尤其对输血后肝炎及急性肝炎的效果较为显著。在机体内它还有抗流感病毒的活性,其与胆酸盐的复合物能强烈抑制流感病毒和腺病毒的生长,并能防止疱疹性病毒感染。

2.2 增强免疫力

溶菌酶作为机体非特异免疫因子之一,参与机体多种免疫反应,在机体正常防御功能和非特异免疫中,具有保持机体生理平衡的重要作用。可改善和增强巨噬细胞吞噬和消化功能,激活白细胞吞噬功能,并能改善细胞抑制剂所导致的白细胞减少,从而增强机体的抵抗力。

2.3 抑菌机理

细菌的细胞壁由胞壁质组成,胞壁质是由N-乙酰氨基葡萄糖及N-乙酰胞壁酸交替组成的多聚物,胞壁酸残基上可以连接多肽,称为肽聚糖。肽聚糖是细菌细胞壁的主要成分,它是由NAM、NAG和肽“尾”(一般是4个氨基酸)组成,NAM与NAG通过 $\beta-1,4$ 糖苷键相连,肽“尾”则是通过D-乳酸羧基连在NAM的第3位碳原子上,肽尾之间通过肽“桥”(肽键或少数几个氨基酸)连接,NAM、NAG、肽“尾”与肽“桥”共同组成了肽聚糖的多层网状结构,作为细胞壁的骨架,上述结构中的任何化学键断裂,皆能导致细菌细胞壁的损伤。溶菌酶能有效地水解细菌细胞壁的肽聚糖,其水解位点是N-乙酰胞壁酸(NAM)的1位碳原子和N-乙酰葡萄糖胺(NAG)的4位碳原子间的 $\beta-1,4$ 糖苷键,结果使细菌细胞壁变得松弛,失去对细胞的保护作用,最后细胞溶解死亡。

对于革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌,其细胞壁中肽聚糖含量不同,革兰氏阳性菌细胞壁几乎全部由肽聚糖组成,而革兰氏阴性菌只有内壁层为肽聚糖,因此,溶菌酶只能破坏革兰氏阳性菌细菌的细胞壁,而对革兰氏阴性菌作用不大。

3 溶菌酶的提取方法

溶菌酶的提取方法主要有以下几种。

3.1 直接结晶法

此法操作简单,成本低,但不能用以分离微量的溶菌酶

3.2 离子交换层析法

利用溶液中各种带电粒子与离子交换剂之间结合力的差异进行物质分离的操作技术,由于具有简便、高效、成本低,且可自动化连续操作的优点,因此一直以来都是溶菌酶生产所常用的方法。常用的离子交换剂有Duolite-464、羧酸纤维素(PC)、羧甲基纤维素(CMC)和羧甲基琼脂糖等。此法具有简便、高效、成本低,且可自动化连续操作的优点^[6]。

3.3 超滤与亲和色谱法结合

这是近年来开发的新方法,首先用超滤除去大部分杂蛋白,保留溶菌酶,此时溶菌酶还较粗,再用亲和层析法得到精制产品^[6]。

3.4 膜色谱技术

膜色谱技术有亲和膜色谱和离子交换膜色谱等。20世纪80年代末,出现了亲和膜色谱技术。该技术兼具膜分离与亲和分离的特点。与传统的膜分离、亲和色谱相比,膜色谱技术不仅具有纯化倍数高、压力小、分离时间短、生物大分子在分离过程中变性概率小,以及允许较快的加料速度等特点,而且比柱亲和色谱更易实现规模化生产^[7]。

4 溶菌酶的检测

由于溶菌酶广泛分布于人体、动植物以及微生物体内,所以测定其含量或者活性便于了解机体的防御能力,作疾病的诊断与鉴别诊断、空气水质污染作为保鲜剂的含量多少的指标之一。测定溶菌酶含量或活性的方法有酶学方法与免疫学方法两大类。酶学方法主要有平皿法、光学测定法与LZM活性细胞化学染色法以及它们原法的改良法。其次还有火箭电泳法、荧光光谱法、快速酶标记测定法以及凝胶电泳染色法与紫外扫描法等。免疫学方法有免疫电泳技术,免疫组化法与ELISA法等^[8]。

5 溶菌酶活性的影响因素

5.1 温度

牛乳中的溶菌酶在温度达到60℃以上时活性降低^[9]。Hayase等发现溶菌酶通过S-S键聚合,180℃时聚合和降解同时进行,当大于200℃时肽键的断裂和重组发生,聚合和降解变得更为剧烈。Frasco

等用红外光谱研究了溶菌酶的热变性机理,发现它是和水结构密切相关的,其它外侧非极性氨基酸残基对变性无重要影响,从外侧极性氨基酸游离出的水在其始变性过程中起重要作用,水进入内部肽-肽键中,使蛋白质膨胀和伸展,研究者们假定变性通过减少蛋白质结晶化、增加整个表面积和可利用的极性水合位促进水变构,这使肽-肽键向肽-水键转化,引起进一步的蛋白膨胀和伸展,当水加入体系时,其它水形成分子单层直至达到新加入的水不再影响蛋白电荷的层数为止。

5.2 pH

溶菌酶在酸性pH下是稳定的,此时100℃的加热对溶菌酶仅有很小的活性损失。

5.3 化学物质对溶菌酶的影响

研究表明糖和聚烯烃类能增加溶菌酶的热稳定性,Hidaka等的研究表明NaCl对溶菌酶也有抗热变性作用,而且盐溶液的存在对溶菌酶的活性是十分必要的。

5.4 加工过程

Fujimaki等研究了在150-300℃焙烤对溶菌酶和酪蛋白的作用,溶菌酶被作为一个纯蛋白质样品在250℃几乎所有溶菌酶的氨基酸被分解,色氨酸、含硫氨基酸、碱性氨基酸和 β -OH氨基酸较酸性氨基酸、脯氨酸、芳香族氨基酸(除色氨酸外)、有烷侧链的氨基酸容易分解。

5.5 络合作用对溶菌酶活性的影响

溶菌酶可和许多物质形成络合物导致其活性丧失。Cunningham等研究表明蛋黄在pH6.2磷酸盐缓冲液中使纯溶菌酶失活,他们观察发现蛋黄污染蛋清仅有两个离子交换色谱峰,而不是无污染的三个峰。Pakinson报道了整蛋的色谱分离时无溶菌酶,并认为其抑制机理是在溶菌酶和蛋黄化合物间形成静电相互作用的络合物所致。N-乙酰葡萄糖胺的 $\beta(1-4)$ 键多聚物是溶菌酶的底物,它们间形成一聚、二聚、三聚、四聚体,是溶菌酶的抑制剂。Imoto分析了SDS和溶菌酶的相互作用,NMR、荧光和UV谱表明在没有引起酶分子整个构象变化的情况下它们之间形成稳定的络合物。XRD分析表明SDS结合到活性位上强烈抑制了溶菌酶活性,除此之外其它和溶菌酶形成络合物的物质有:胸腺泡核、酵母泡核、甲状腺素、甲状腺球蛋白、 α -La、咪唑核嘌呤衍生物。阳离子如 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 等均可抑制溶菌酶的活性(10^{-3} - 10^{-2}mol/L)。

6 溶菌酶在肉品保鲜中的应用

溶菌酶是一种无毒、无副作用的蛋白质,又具有一定的溶菌作用,因此可用作食品防腐剂。

白建^[10]对冷却猪肉的保鲜期进行了研究,通过试验得出使用生物保鲜剂——溶菌酶并采用真空包装,保鲜期达到15d时,色泽红润、TVBN值仍在一级鲜度的标准内,且在整个过程中能有效控制肉样的pH变化,保鲜效果较好。马美湖^[11]等进行了GNa液、溶菌酶、Nisin单一因子对冷却肉保鲜效果的比较试验研究,研究表明,溶菌酶单独使用时显著优于GNa,略优于Nisin,且溶菌酶对抑制细菌总数的增殖、减缓TVB-N值上升具有及其重要的作用。当前国内外保鲜剂开发的方向是多种防腐剂混合形成复合保鲜剂,这既能扩大单一保鲜剂的作用范围,还能降低单一保鲜剂的作用量,同时得到更好的保鲜效果。国外有报道,乳铁蛋白与溶菌酶联合作用后能增强抑菌效果^[12],溶菌酶首先对细胞壁进行溶解,乳铁蛋白使胞壁溶解完全或不完全的细菌粘连在一起而产生协同抑菌作用。在国内也进行了此方面的研究并取得了一定的成果。马美湖等^[13]人采用复合保鲜的方法对分割托盘小包装冷却肉的保鲜技术进行了研究,研究发现在非真空托盘包装保鲜的条件下,Nisin、溶菌酶、GNa的共同使用,对细菌的增长有一定的抑制作用,而且能有效抑制脂肪的酸败。马美湖^[14]对溶菌酶、乳酸菌肽(Nisin)在冷却肉中的保鲜效果,结合山梨酸钾保鲜成分,进行了正交试验,根据 $L_9(3^4)$ 正交试验结果进行的极差分析,采用浓度为2.5%的Nisin,浓度为2.5%的溶菌酶和2%的山梨酸钾,用乳酸将这种冷却肉保鲜液调pH至4.5,保鲜效果良好,保鲜时间达到30d左右。孙卫青^[15]进行了天然保鲜液对冷却猪肉保鲜效果的研究,结果发现:由壳聚糖(0.5%)、混合香辛料浸提液(2.5%)、蜂胶(0.1%)、Nisin-溶菌酶(0.15%)和茶多酚(0.5%)混合得到的保鲜液贮存稳定性好,对各种菌的抑制力均较强,可使冷却猪肉表面的初始菌数降低1-3个数量级,在贮存第21天,细菌总数、假单胞菌属、肠杆菌科、乳酸菌、热死环丝菌和嗜冷菌的对数值分别为5.176、5.342、5.000、5.447、3.114和3.980,TVB-N值为11.0mg/100g,7种生物胺指标均达到保鲜目标要求,产品色泽为紫红色,保鲜效果很理想。郭良辉^[16]等人研究了冷藏条件下用Nisin与溶菌酶等几种复合生物保鲜剂对三角帆蚌的保鲜效果。结果表明:Nisin和溶菌

酶单独使用或混合添加具有明显的保鲜效果，混合添加保鲜效果最佳，在其他相同的情况下，可延长保鲜期约1倍或更长的时间。保鲜剂不只是在冷却肉保鲜中能发挥其栅栏因子的作用，在肉制品中同样有效，研究表明将溶菌酶添加于熟香肠、色拉米香肠和维也纳香肠，发现加热处理后溶菌酶、NaCl、NaNO₂，三者结合较单独使用效果要好。康怀彬^[17]等人的研究表明，采用0.05%Nisin、0.05%溶菌酶、2%乳酸钠和1%双乙酸钠组成的复合防腐保鲜剂、真空包装和真空包装后低温二次杀菌相结合的综合保鲜技术保鲜烧鸡，能有效抑制烧鸡储藏期间的菌落总数，延缓TVB-N值和TBA值的变化，改善感官质量，烧鸡在15-20℃条件下贮藏保质期可达60d。

二 乳铁蛋白

乳铁蛋白(Lactoferrin, LF)是一条分子量约为80kDa的铁结合性糖蛋白，其多肽链上结合有两条糖链，含量为7%左右，组成包括半乳糖、甘露糖、N-乙酰半乳糖胺、岩藻糖以及涎酸等。人乳中的LF和牛乳中的LF是目前研究最多的，其全部氨基酸序列已清楚。1984年法国Metz-Boutige等首先测定了牛乳中LF整个氨基酸序列，其多肽链是由703个氨基酸残基组成，而且人乳中的乳铁蛋白的一级结构已经确定，与牛乳中的乳铁蛋白相比较，二者氨基酸顺序的同源性达到69%。牛乳中乳铁蛋白(bovine lactoferrin, BLF)的氨基酸序列如图1所示。

```

1  APRKNVRWCISOPW[FKCRRWQWRMKLGAPSTCVRRAF]ARECIRAI
50  AEKKADAVII(D)GGMVFEACDRKLRPVAAEYGTKEPQTH(Y)YAVAVVK
100  KGSNIQIDQGRKSCHTGLGRSAGWVPMGILRPYLWTESEFLQGAV
150  AKFISASCVCIDRQAYPNLCQCKGEGEVNQACSSREPYFG(Y)SGAFKCL
200  QDGAGDVAFFVKETTVPENLEKADRDQYELLCLN*NSRVAPVDFAFKECHLAQ
250  VPS(H)AVVARSVDGKEDLIWKLKSAQKFGKN*KSRSFQFGSPGQRDLL
300  FKDSALGLRIPKVSALYLASYRLTTLKLNRETAEEVKARYTRVWCA
350  VGPEEQ[KKQQWWSQQSQN*VTCATAST]TDDCTVLVLKGEADALNLD(D)GGYI
400  YTAGCGLVPVLAENRKSQYSSLDCLVRPIEG(Y)LAHAVVKKANEGLTWN
450  SLDKKSCHTAVDRTAGWNIPMGLIVN*QTGSCAFDEFFSQSCAPGRDPKS
500  RLICALCAGDDQGLDKCVPNSKEYYG(Y)TGAFRCLEADVGDAFVKN*DTVW
550  ENTNGESTADWAKNLNREDFRLLCLDGTGRKPVTEAQSCILAVAPN(H)AVVS
600  RSDRAAHVKQVLLHQALFGKNGKNCDFKCLFXSETKNLLFNDNTECLA
650  KLGGRPTYEEYLGTEYVTAIANLKKCSTSPLEACAFLTR
    
```

图2 BLF的分子特征

注：实线和虚线方框表示N端和C端2个相对应的圆环结构氨基酸残基组成：括号表示推测的铁结合氨基酸残基；带星点的氨基酸位表示潜在的糖键结合位点。

LF的立体结构主要呈“二枚银杏叶型”，分别在分子的N端和C端形成两个环状结构，每叶在内部缝隙处都有一个铁结合位点。此二叶结构有较高的重叠性，即N端大约有40%的组成与C端

相似，因此这两部分又可被限制分解为两部分，每部分都有一个单独的铁结合位点。其不同之处在于表面环状叶结构，每叶都有两个相似的 α/β 区域，其中一叶基于6束 β -层状结构，另一叶基于5束 β -层状结构。目前X衍射的最大分辨率还不能区分这两个铁位点的不同^[18]。每一个三价铁原子与乳铁蛋白上的4个残基相连(2个酪氨酸、1个天门冬氨酸、1个组氨酸)，另外还有一个CO₃²⁻离子(或2个HCO₃⁻离子)结合于铁离子，此阴离子占据了铁离子与乳铁蛋白上2个带正电的氨基酸(精氨酸和N-端)的空隙，可能是由于它中和了这两个氨基酸的电负性。但乳铁蛋白的N端和C端存在着不同的铁结合稳定性，N端也对酸显出更不稳定性。研究表明，LF的铁结合稳定性主要是由于N端叶与C端叶之间相互作用的结果。

铁离子结合到LF后会引后者的构象变化，使LF分子结构更加紧密。铁进入到每个叶敞开的缝隙内部，然后此区域再相应闭合。LF的这种构象变化也解释了铁饱和LF比脱铁LF更不易变性和水解的缘故(特别对于C-叶结构，因为它的结构比N-叶更紧密)。而LF比铁蛋白具有更强的铁结合要求，这解释了LF如何能维持铁在一个较广的pH范围内，这也是LF铁结合功能的关键性质。BLF与HLF的结构相似，在其晶体结构中，Phe17和Leu29之间形成了一个 α -螺旋结构，Ser33和Arg39则为无卷曲结构，使一个平行 β -折叠结构与它的N端相连。还有研究表明，Phe17和Leu29之间的多肽段具有较强的抗菌活性，如果将 α -螺旋结构改变为 β -折叠结构，其抗菌活性将有较大的提高，可能是由于 β -折叠结构轻易与细菌表面接触。

1 乳铁蛋白的生物学特性

1.1 促进铁吸收

LF和转铁蛋白是体内运送铁的主要蛋白质。LF主要在肠道中运送铁，对哺乳动物从肠道中吸收铁起着重要作用；而转铁蛋白主要在血液中运送铁；Lf与铁的亲和力是转铁蛋白的250-300倍，而且能在pH2.2的情况下不受损的载铁通过胃。当LF到达肠道后，即和细胞表面的LF受体起反应，然后LF受体进入细胞内部，释放出Fe³⁺。细胞对铁的吸收有负反馈调节机制，当胞内缺铁时细胞表面的LF受体增多，增加LF与其受体结合。

1.2 抗菌作用

在诸多生物学功能当中，其抗菌活性最引人

注目。LF 属于广谱抑菌剂,即抑制需铁的革兰氏阴性菌(如大肠菌群、沙门氏菌等),也抑制革兰氏阳性菌(如金黄色葡萄球菌)^[19]。Tomita(1991)等研究了牛乳铁蛋白(BLF)经蛋白酶降解后产生的多肽的抗菌作用,结果表明,猪胰蛋白酶水解所得小分子多肽抗菌活性显著提高,具有广谱抗菌活性,其中包括对LF具有抗性的菌株,水解多肽的活性至少为LF的8倍。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^[20,21]。LF还能减缓肠道受感染程度,提高其抗感染力。另有报道表明LF可以抑制、杀死多种真菌^[22]。

1.3 免疫调节活性

LF对抗体生成、T细胞成熟、某些细胞因子生成及前列腺素生成等都有调节作用。而噬中性粒细胞是含LF最多的细胞,当机体受感染时可将LF释放出来,夺取致病菌的铁离子致其死亡。另外,研究显示,LF对抗体生成、T细胞成熟、淋巴细胞中自然杀伤细胞比例都具有调节作用^[23]。由脂多糖组成的微生物细胞膜结合在LF上,因此LF可以防止细胞膜免疫失控的发生,体外模拟试验以及对鼠类动物和小猪体内试验都证实了LF具有调节免疫的功能^[24]。

1.4 抗氧化作用

较早以前就有人报道,在pH值为7.4的NaCl溶液中,饱和度为20%的LF抑制了牛脑磷脂脂质的抗坏血酸铁盐催化的磷脂过氧化反应。LF还降低羟自由基产生的可能,从而抑制了单核细胞膜的铁催化自动氧化反应。因此,可认为LF的抗氧化机制主要是螯合了易引起氧化的铁离子。研究表明,LF能抑制铁诱导的脂质氧化过程所产生的硫代巴比妥酸和丙二醛的生成。另外,BLF能降解酵母中的转运RNA,具有核糖核酸酶的活性,且能抑制超氧离子的形成。LF能抑制脂质氧化,保证炎症部位的中性粒细胞免受氧化损害。在单核巨噬细胞呼吸爆发时,LF能抑制氢氧根基团的产生以保证其最佳功能,并保护临近组织免受损伤。所有这些都降低人体内自由基对动脉血管壁弹性蛋白的破坏,达到预防和治疗动脉粥样硬化和冠心病的目的。由于乳铁蛋白能结合铁离子,抑制了由铁引起的脂氧化作用,阻断了氧自由基的生成。噬中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞等是通过过氧负离子杀死侵入机体的致病菌,而聚集在炎症或受感染处的三价铁离子和二价铁离子会催化上述自由基反应,导致机体出现过多的氧自由基。

LF能结合铁,使其不会催化氧自由基反应^[25]。

1.5 抗病毒功能

LF在宿主体内对抵抗病毒感染有很大的作用,研究表明,对丙肝病毒(HVC)、单纯疱疹病毒(HSV)、细胞巨化病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)、人肠道弧病毒、多瘤病毒等的感染具有强烈的抑制作用^[26-30]。关于抑制病毒的机制目前上不是很清楚,可能的机制之一是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。也可能是LF无直接的抗病毒效果,而是通过间接地调节免疫系统的抗病毒反应来达到抗病毒的目的^[27]。

2 乳铁蛋白的抑菌机制

LF的抑菌作用目前主要有“铁剥夺”、“膜渗透”和“酶抑制”三种机制。

2.1 “铁剥夺”机制

乳铁蛋白是铁结合性的糖蛋白,它可以与病原性微生物竞争性地结合铁离子,因为病原菌的毒性与其从环境中获取铁离子有关。除乳酸杆菌外,几乎所有细菌的生长都需要铁,铁离子对细菌中生物氧化酶是必需的,LF与之竞争铁造成微生物生长的铁缺乏环境,从而导致病原微生物的死亡^[28]。缺铁型LF即通过与需铁细菌争夺可利用铁而达到抑菌的目的。

其次,在胞内的吞噬溶酶体中的酸性环境条件下,螯合铁离子的乳铁蛋白可通过提供游离铁离子,催化自由基生长方式,对吞噬溶酶体内的微生物产生杀伤作用。抑菌活性取决于铁离子的饱和程度。研究表明,当培养基中加入 Fe^{3+} 时,随铁离子浓度的增加,其抑菌作用下降,加入过量的铁离子后,LF的抑菌作用完全消失,即饱和程度越高,抑菌活性就越弱^[29]。

2.2 “膜渗透”机制

LF还可直接与细菌细胞壁结合造成胞壁损伤,该作用可能与细菌竞争结合 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的特性有关^[30]。LF通过蛋白酶水解获得乳铁蛋白活性多肽,这些肽的抗菌活性大幅度增强,可抑制革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌生长,其中包括一些对LF具有抵抗性的菌株^[28,31]。但是研究表明乳铁蛋白和乳铁蛋白肽的抑菌机制,不仅仅是简单的营养铁的剥夺。Aronid等人的研究表明即使有外源性铁存在时,乳铁蛋白对变异链球菌依然是有抑菌活性的^[32]。Bortner等人进而提出不依赖铁的乳铁蛋白杀菌的原因在于乳铁蛋白和细菌表面的直接结合。乳铁

蛋白肽带正电荷,与带负电荷的磷脂和脂多糖具有很强的亲和性,因此,他们具有亲膜活性,从而增强了细胞膜的通透性。这种作用与多黏芽孢杆菌产生的具有抑菌活性的多黏菌素 B 的亲膜特性很相似。因此,乳铁蛋白肽对微生物的致死作用,体现为脂多糖的释放而导致的细胞膜生理功能的彻底破坏。 G^- 的外膜对于乳铁蛋白肽直接进入细胞质膜起着一种屏障作用。脂多糖的结构会影响革兰氏阴性菌对乳铁蛋白的敏感性,当其结构链缩短时,乳铁蛋白的致死浓度也随之下降。革兰氏阳性菌由于细胞壁中负电荷成分(如磷脂脂质体)的存在,会和带正电荷的乳铁蛋白肽结合,从而阻断了乳铁蛋白肽进入细胞膜中的致死靶位,这些成分结构和数量的不同,造成革兰氏阳性菌对乳铁蛋白肽敏感性的差异。中和细胞表面的负电荷,会降低具有亲膜活性的乳铁蛋白肽与致死靶位的亲和性。

Shimazaki 等人的研究表明,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,导致脂多糖的释放,由此破坏细菌细胞质膜的生理功能^[33]。Lassiter 等的研究表明,细菌表面的靶位是阴离子。进一步的研究表明,随着脂多糖从细胞膜表面的释放,乳铁蛋白与革兰氏阴性菌表面脂多糖的脂质 A 结合,添加脂质 A 可抑制乳铁蛋白与脂多糖的结合,和添加多黏菌素的效果一样^[34]。

2.3 “酶抑制”机制

Ohashi 等人的研究发现,乳铁蛋白对半胱氨酸蛋白酶有强烈的抑制作用。其 C 末端的 17 个碱基序列显示与半胱氨酸蛋白酶抑制剂的通常的活性部位有 60% 的一致性和 90% 的同源性^[35]。因此,乳铁蛋白被认为是半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族中的一员。已有报道表面,在皮肤中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 α 对金黄色葡萄球菌 V8 有抑菌活性。因此,乳铁蛋白对细菌的抑制作用可能是抑制了细菌的半胱氨酸蛋白酶。而且不论是否存在 Fe^{3+} ,乳铁蛋白对这些半胱氨酸蛋白酶都有相同的抑制作用,因此被结合的铁离子和铁离子的结合域不参与此种抑制作用。由于乳铁蛋白对木瓜蛋白酶的抑制动力学是非竞争性的,因此可以表明乳铁蛋白不与木瓜蛋白酶的底物竞争,乳铁蛋白具有铁载体与半胱氨酸蛋白酶抑制剂双重作用。

2.4 其他机制

从激活的中性白血球中释出的 LF 能通过调节

全身免疫应答而发挥出抗微生物活性。目前已在一些细胞中发现对乳铁蛋白具有高度亲和性的受体,包括淋巴细胞、巨噬细胞、血小板等。乳铁蛋白对全身免疫应答作用的分子机制还有待继续阐明,但已有有关调节细胞因子释放的报告^[36]。

乳铁蛋白也可与黏膜分泌物中其他抗菌物质,如溶菌酶协同作用^[37],在这种情况下,即使铁已饱和的 LF 也能产生抗菌作用,但这种抑菌效应是通过被溶菌酶作用过的受损细菌的凝集作用而引起的。抗体(IgA)也能增强 LF 的抑菌作用,这可能是阻止微生物转铁成分的生成,或封闭微生物转铁成分对铁离子的吸收所致。

3 乳铁蛋白抑菌活性的影响因素

乳铁蛋白的生物活性受多种因素的制约,盐类、铁含量、pH 值、抗体或其他免疫物质、介质等均影响其生物活性。

3.1 铁饱和度

LF 的铁含量对抑菌作用有决定性作用,卢蓉蓉(2008)等人的研究表明随着铁饱和度的增加,LF 的二级结构发生了改变, α -螺旋构象逐步转变为 β -折叠构象,蛋白质分子排列的有序性增加,因而 LF 的结构变得更为紧密,LF 两叶环状结构闭合,铁结合能力下降,因此抑菌活性下降。而且 LF 的 N-叶和 C-叶铁结合能力不同造成热稳定性差异,低饱和度时,较高的抑菌活性主要来自于 C-叶的贡献^[38]。

3.2 温度

有实验表明,乳铁蛋白对放线杆菌的抑菌作用受温度影响很大,36 和 37 条件下抑菌效果相近,39 的抑菌作用明显强于 37,22 时乳铁蛋白对菌的存活基本没有影响。

3.3 乳铁蛋白的抑菌活性受到环境的影响

乳铁蛋白的抑菌效果和 pH 值密切相关。在 pH 为 7.5-8.0 时抑菌效果最佳。pH 对革兰氏阴性菌影响不大,而对革兰氏阳性菌影响较大。pH < 6 基本无抑菌作用。LF 经过 70 以下的巴氏杀菌后抑菌活性没有影响。当 HCO_3^- 浓度增加 LF 的抑菌活性增强;柠檬酸钠和阳离子浓度的增加可使其抑菌活性下降。在 50mmol/L 磷酸盐缓冲液中,任何 pH 条件下乳铁蛋白都没有抑菌作用。

3.4 抗体或其他免疫物质

Bullen 证实乳铁蛋白对埃希氏大肠杆菌的抑制可因其抗体的存在而增强^[39]。Stephen 的研究表明乳铁蛋白和 IgA 抑菌有协同作用^[40]。

4 乳铁蛋白的检测方法

对乳铁蛋白的检测方法主要分为两类：免疫学方法和非免疫学方法。

其中免疫学方法包括用于定量检测的酶联免疫法、单相免疫扩散法和用于定性检测的双相免疫扩散法，其特点为操作简便、快速、准确、特异性强，是一种实验室和生产中都普遍适用的检测方法。

非免疫学方法包括电泳法和高效液相法。其中电泳法是通过测定样品的等电点值进行定性检测，不能定量检测，而且操作复杂；高效液相色谱法操作快速简便，但费用高，不能作提取过程中的监测。

5 乳铁蛋白在肉品中的应用研究进展

早在1988年日本就已将乳铁蛋白应用于婴儿食品中，乳铁蛋白对肉类表面易生长的30多种致病菌具有强烈的抑制作用，不仅能抑制通过食品传染的致病菌，包括：*E.coli* O₁₅₇ H₇，*Listeria monocytogenes*，*Salmonella* spp.，*Campylobacter* I1577 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的作用，如对多种耐药性的*Salmonella typhimurium* DT104以及青霉抗性的*Staphylococcus aureus*。当前人们正在研究把乳铁蛋白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；乳铁蛋白的抗氧化作用与褪黑素、维生素等一并成为机体内非常重要的抗氧化剂。乳铁蛋白已被美国FDA和美国农业部批准用于新鲜肉类防腐的辅助剂，将LF喷洒到肉类胴体和分割肉表面，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、韩国等国家，乳铁蛋白都已被允许应用^[41]。

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，结果乳铁蛋白对有害病菌产生了抑制作用并阻止病菌侵蚀肉的表层。研究者说，这一实验提供了在不影响肉的口感、色泽和风味的前提下而杀灭病菌的一种安全、自然的方法。邱群惠（1994）等人探讨了乳铁蛋白对真空包装中式香肠的细菌总数以及红度值的影响，研究结果表明乳铁蛋白对中式香肠中的微生物的抑菌效果在贮藏期的0-15天较为显著，而且乳铁蛋白处理组的TBARS值低于其他组，红度值以及pH值也都高于对照组^[42]。付丽（2006）等人研究了乳铁蛋白对冷却猪肉的护色

效果，研究结果表明乳铁蛋白溶液具有较好的抗氧化性能，添加浓度为2mg/ml时抗氧化效果最好，其与Vc、VE的协同抗氧化作用明显。而且经过感官颜色的评定，得出乳铁蛋白处理组的红度值要高于对照组^[43]。

三、展望

溶菌酶和乳铁蛋白都具有抗菌的作用，都可以作为一种新型、安全、高效的食品添加剂，随着研究的深入，对其抗菌的机制也愈来愈明了，其中溶菌酶是集药理、保健和防腐三种功能于一体，乳铁蛋白则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，所以将他们用于肉制品的防腐保鲜具有十分广阔的市场前景。而且肉类保鲜是一个复杂的系统工程，没有任何一种单一的保鲜措施是完美无缺的，为了获得更好的保鲜效果，必须采用综合保鲜技术。目前食品保鲜研究的主要理论依据是栅栏因子理论，在实际应用中，我们应当综合运用各种保鲜方法，并将其合理的组合起来，从而抑制肉及其肉制品从屠宰、加工、包装、储藏和运输过程中的腐败变质。

参考文献

- [1] 方元超,梅丛笑,尹宁.溶菌酶及其应用前景[J].中国食品添加剂,1999(4):39-43.
- [2] Blake C. C. K.,Koen D. F., Mair G.A.Structure of hen eggwhite lysozyme[J].Nature,1965,206:757.
- [3] 沈同,王镜岩.生物化学.北京:高等教育出版社,1990:280-281.
- [4] 朱奇,陈彦.溶菌酶及其应用.生物学通报,1998,33(10):9-10.
- [5] 梁爱华,大野尚仁,宿前利郎.鸡蛋清溶菌酶与B2内酰胺类抗生素联合应用对大肠埃希氏菌生物特性的影响.中国抗生素杂志.2001,26(5):371-374.
- [6] 倪瑛.天然防腐剂——溶菌酶的研究[J].食品研究与开发,2003,24(2):107-109.
- [7] 甘宏宇.亲和膜色谱技术研究进展[J].分析化学,1999,27(1):111.
- [8] 白丰沛.溶菌酶的测定方法及其实际意义[J].佳木斯医学院学报,1996,19(1):69-72.
- [9] Weaver,L.H.,Matthews,B.W.Structure of bacteriophage t4 lysozyme refined at 1.7 angstroms resolution [J].J.Mol.Biol.1987,193,189-199.
- [10] 白建.冷却肉保鲜技术的新研究.肉类研究,2006,

- 7:43-45.
- [11] 马美湖,葛长荣,张凤凯.三种保鲜剂的比较试验.肉类研究,2003,1:32-37.
- [12] Sebastien,F., Robert, W E. Lactoferrin-a multifunctional protein with anti-microbial properties[J].Molecular immunology.2003,40:395-405.
- [13] 马美湖,等.分割托盘小包装冷却肉保鲜技术研究[J].肉类研究,2008,2:60-67.
- [14] 马美湖,等.冷却肉生产中保鲜技术的研究[J].食品科学,2005,26(3):235-243.
- [15] 孙卫青,等.天然保鲜液对冷却猪肉保鲜效果的研究[J].中国农业科学.2007,40(8):1835-1842.
- [16] 郭良辉,许巧倩,许永久.溶菌酶与 Nisin 复合生物保鲜剂对蚌肉的保鲜效果[J].水利渔业,2007,27(4):112-115.
- [17] 康怀彬,徐幸莲,张敏,肖枫.烧鸡综合保鲜技术研究[J].食品科学,2006,27(10):556-559.
- [18] Mauro F.,Gabriella F.,Fabio P.1HNMNMR relaxometric characterization of bovine lactoferrin[J].J Inorg Biochem. 2004,98:1421-1426.
- [19] 黄海青,汪以真.乳铁蛋白肽的研究进展[J].中国兽药杂志,2004,38(6):15-18.
- [20] Omita M.Potent antibacterial generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin[J].J. Dairy Sci,1997,74: 4137-4124.
- [21] Arnold K. R.Biological activity of human lactoferrin: Sensitivity of a variety of microorganisms[J].Infect Immun,1980,28:893-898.
- [22] Palma C.,Serbonsek D.,Torosantussi A.Identification of a mannoprotein fraction from candida albicans that enhances human polymorphonuclear leucocyte (PMNL) functions and stimulates lactoferrin in PMNL inhibition of candidal growth[J].J Infect Dis,1992,166: 1103-1112.
- [23] Angeles E. M.,Alejandro R.,Alberto C.Effects of lactoferrin on non-specific immune responses of gilthead seabream (sparus auratus L.)[J].Fish Shellfish Immunol, 2005,18:109-124.
- [24] Jolanta A.,Michal Z.,Maria P.Orally administered lactoferrin restores humoral immune response in immunocompromised mice[J].Immunol Lett,2003, 89:9-15.
- [25] Butter G.R.,Jurkiewicz B.A.Catalyticmetals,ascorbate and free radicals: combinations to avoid[J].Radiat Res, 1996,145(5):532-541.
- [26] 洪俊,林西霖,洪流.在体外用人乳铁蛋白抑制丙型肝炎病毒感染研究初探[J].中华肝脏病杂志, 2001, 9(2):126-126.
- [27] Van D.S.,et al.Antiviral activities of lactoferrin[J]. Antiviral Research,2001,52(3):225-239.
- [28] Dionysius A.,Milne M.Antibacterial peptides of bovine lactoferrin:purification and characterization[J].J.Dairy Sci, 1997,80:667-674.
- [29] 乔东林,林庆威.乳铁蛋白抗奶牛乳房炎作用的探讨[J].黑龙江动物繁殖,2004,12(1):40-41.
- [30] Ellison R.T.,et al.Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferring [J].Infection and Immunity,1998,56:2774-2781.
- [31] 凌雪萍,庞广吕,刑伟.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): 18-21.
- [32] Aronld R.R.,Russel J. E.,Champion W.J.Bactericidal activity of human lactoferrin: influence of physical conditions and metabolic state of the target microorganism [J]. Infect Immun,1981,32:655-660.
- [33] Shimazaki K.I.,Tsuda H.,Tomita M.Lactoferrin: structure, function and applications[A].Experta Medica International Congress Series[C].Amsterdam:Elsevier,1998,1195.
- [34] Lassiter M.O.,Newsome A.L.,Sams L.D.Characterization of lactoferrin interaction with Streptococcus mutans[J].J Dental Res.1987,66:480-485.
- [35] Ohashi A., Murata E.,Yamamoto K.New functions of lactoferrinand β -casein in mammalian milk as cysteine protease in hibitors[J].Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 306:98-103.
- [36] Ellison R.T.,Giechl T.J.,Laforce F.M.Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferring[J].Infection and Immunity, 1998,56:2774-2781.
- [37] 凌雪萍,等.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):18-21.
- [38] 卢蓉蓉,许时婴,杨瑞金,孙震.乳铁蛋白抑菌活性及机理研究[J].食品科学,2008,29(2):238-243.
- [39] Bullen J J.,Rogers H J.,Spalding P B.Iron and infection: the heart of the matter[J].FEMS Immunology and Medical Microbiology,2005,43(3):325-330.
- [40] Stephens S.Immunology.1980,41:597.
- [41] 杨严俊,周建新.免疫活性蛋白的开发及其在乳制品中的应用.2001,1:34-38.
- [42] 邱群惠,郭俊钦.乳铁蛋白对中式香肠微生物品质及脂质氧化之影响[J].台湾农业化学与食品科学.1994,43(10):325-334.
- [43] 付丽,赵玮,孔保华.乳铁蛋白对冷却猪肉的护色效果[J].肉类工业,2006,7:25-27.