

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對肉製品抗氧化性及抗菌性之探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2313-B-029-003-

執行期間：94 年 08 月 01 日至 95 年 07 月 31 日

執行單位：東海大學食品科學系

計畫主持人：郭俊欽

計畫參與人員：張建銘, 蔣力惠

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 31 日

## 摘要

本試驗利用胃蛋白酶於 pH 2.5、37°C 的條件下對牛乳鐵蛋白 (bovine lactoferrin; LF) 進行 4 小時的水解反應，以製備牛乳鐵蛋白水解物 (bovine lactoferrin hydrolysate; LFH) 並探討水解物及 EDTA 的抗氧化性及抗菌性。本試驗共分三個部份，第一部份探討牛乳鐵蛋白及其水解物 (水解率為 6.88%) 的抗菌效果，結果發現兩者對 *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 的最小抑菌濃度分別為 2.0 與 0.25 mg/mL，而牛乳鐵蛋白對 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14207 無抑制效果，但水解物對該菌的最小抑菌濃度為 2.0 mg/ml。蛋白質電泳分析結果發現，水解產物主要是分子量在 3.496 kD-6.512 kD 之間的胜肽乳鐵蛋白水解物 (Lactoferrin hydrolysate)，經陽離子樹脂純化後，利用高效液相層析儀分析 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 收集乳鐵蛋白素 (Lactoferricin) 並探討其抑菌效果，其為濃度 8.1 mg/ml 之多胜肽水溶液，所含之抗菌胜肽(含乳鐵蛋白素) 約為 1.08mg/ml。乳鐵蛋白素對 *L. monocytogenes* 之最小抑菌濃度為 50 µg/ml。本實驗進一步把乳鐵蛋白水解液 (500 µg/ml) 加熱 (100°C) 0、5 及 10 分鐘後離心並分析上澄液之乳鐵蛋白素含量；發現未加熱但經離心之上澄液所含抗菌胜肽濃度為 1.06 mg/ml，為原始濃度之 98%，可知乳鐵蛋白素大部分存在於乳鐵蛋白水解液之上澄液中；但經

加熱 5 分鐘後離心之上澄液所含抗菌肽濃度為 0.62 mg/ml，為原始濃度之 58.5%；而加熱 10 分鐘離心後之上澄液所含乳抗菌肽為 0.425 mg/ml，只剩原始濃度之 40.1%；證明加熱時間越長，乳鐵蛋白水解液之上澄液所含乳鐵蛋白素濃度越低。

另將乳鐵蛋白水解液之稀釋液，濃度為 125、250、500 及 1000  $\mu\text{g/ml}$ ，在 100°C 下加熱 0、5、10、15、20、25、30 及 60 分鐘，冷卻後分別測試對於兩株病原菌：革蘭氏陽性菌 (*Listeria monocytogenes*) 及革蘭氏陰性菌 (*Salmonella typhimurium*) 之抑菌效果，結果發現不論是否加熱或加熱時間長短，乳鐵蛋白水解液之濃度為 125  $\mu\text{g/ml}$  時，其無抑菌效果，而濃度為 500  $\mu\text{g/ml}$  或以上時，其對兩株病原菌有顯著抑制效果。當濃度為 250  $\mu\text{g/ml}$  時，未加熱之水解液對於兩株病原菌也具抑制效果，但經加熱 10 分鐘後，其對 *S. typhimurium* 的抑菌效果會顯著降低 ( $P < 0.05$ )；經加熱 30 分鐘後，對 *L. monocytogenes* 的抑菌效果會顯著的下降 ( $P < 0.05$ )。

。第二部分是探討 EDTA (添加 250 ppm EDTA)、LFH (添加 4 mg/g meat 的乳鐵蛋白水解物) 與 LFH+EDTA (添加 4 mg/g meat 的水解物及 250 ppm EDTA) 和貯藏時間 (0、2、4 及 6 天) 對非真空包裝 (non-vacuum packaging) 豬後腿絞肉之 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) 值、非血基質鐵 (nonheme iron)、總生菌數 (total

plate counts)、乳酸菌數 (lactic acid bacterial counts) 及大腸桿菌群數 (coliforms) 之影響。在 TBARS 值方面，於第 4 及 6 天，LFH 組之 TBARS 值顯著高於其他三組，這表示乳鐵蛋白水解物似乎會促進脂肪氧化，但 LFH+EDTA 組則可能添加 EDTA 而使其 TBARS 值維持較低。在非血基質鐵方面，LFH 組的非血基質鐵含量較控制組高，但 LFH+EDTA 組則與控制組無異，以 EDTA 組最低。在微生物生長方面，處理組之總生菌數、乳酸菌數及大腸桿菌群數皆低於控制組，顯示添加 LFH 及/或 EDTA 能抑制微生物生長。當與控制組比較，EDTA 組及 LFH 組可分別減少總生菌數約 0.62 及 0.51 個對數值 (log CFU/g)，對乳酸菌而言，可分別減少 0.68 及 0.44 個對數值，對大腸桿菌群而言，可分別減少 0.56 及 0.24 個對數值；但 LFH+EDTA 組因同時添加 LFH 與 EDTA，因此可減少較多總生菌數、乳酸菌數與大腸桿菌群數分別為 0.82、0.76 與 0.64 個對數值。

第三部份是探討 EDTA (添加 250 ppm EDTA)、LFH (添加 4 mg/g meat 的乳鐵蛋白水解物) 與 LFH+EDTA (添加 4 mg/g meat 的水解物及 250 ppm EDTA) 和貯藏時間 (0、2、4、6 及 8 天) 對非真空包裝 (non-vacuum packaging) 貢丸之總生菌數之影響。結果發現處理組之總生菌數皆低於控制組，顯示添加 LFH 及/或 EDTA 能抑制微生物生長。當與控制組比較，EDTA 組及 LFH 組皆可減少總生菌數約 0.16

個對數值；但 LFH+EDTA 組因同時添加 LFH 與 EDTA，因此可減少較多總生菌數 (0.36 個對數值)。

關鍵語：牛乳鐵蛋白水解物、抗菌胜肽、乳鐵蛋白素、EDTA、貢丸

## Abstract

In this study, lactoferrin hydrolysate (LFH) was prepared by pepsin cleavage of bovine lactoferrin (LF) at 37°C and pH 2.5, and the purposes of this study are to investigate the anti-microbial and anti-oxidative properties of LFH and EDTA. The study was divided into three parts. The first part is to investigate the antimicrobial activities of LF and LFH which percent hydrolysis is 6.88%. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of LF and LFH toward *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 are 2.0 and 0.25 mg/mL, respectively. LF shows no antibacterial activity to *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14207, but the MIC of LFH to this strain is 2.0 mg/mL. The SDS-PAGE of LFH shows that LFH could produce 3.496-6.512 kD fragments. Lactoferrin hydrolysate was purified by cation-exchanged resin and analysed by high performance liquid chromatography to collect antimicrobial peptide - lactoferricin to investigate for its antimicrobial activity. The concentration of polypeptide of lactoferrin hydrolysate is 8.1 mg/ml including the antimicrobial peptides (lactoferricin) 1.08 mg/ml. Lactoferrin hydrolysate was heat at 100°C for 0 (LfHS<sub>1</sub>), 5 (H5-LfHS<sub>1</sub>) and 10 (H10-LfHS<sub>1</sub>) minutes, than collected the suspended liquid of lactoferrin hydrolysate after centrifugation to analyse the concentration of antimicrobial peptides. The concentration of antimicrobial peptides in LfHS<sub>1</sub> is 1.06 mg/ml, and it was 98% of original consistence. The result was meant that the most of antimicrobial peptides was existed in the suspended liquid of lactoferrin hydrolysate. The concentration of antimicrobial peptides in H5-LfHS<sub>1</sub> and H10-LfHS<sub>1</sub> is 0.62 mg/ml and 0.425 mg/ml respectively, than they were

58.5% and 40.1% of original consistence. It was proved that the longer heating time the lower concentration of antimicrobial peptides in suspended liquid of lactoferrin hydrolysate.

The experiment to investigate that antimicrobial activity of lactoferrin hydrolysate was diluted to 125, 250, 500 and 1000 µg/ml, and heat 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 60 minutes at 100°C to two pathogenic bacteria: *Listeria monocytogenes* (gram positive bacteria) and *Salmonella typhimurium* (gram negative bacteria). The results were non-antimicrobial activity in 125µg/ml lactoferrin hydrolysate, inversely, lactoferrin hydrolysate at 500 µg/ml had significantly antimicrobial activity. Lactoferrin hydrolysate at 250 µg/ml still have antimicrobial activity, but the antimicrobial activity significantly degraded to *S. typhimurium* after heating 10 minutes and to *L. monocytogenes* after heating 30 minutes.

The second part is to investigate the microbial and chemical properties of non-vacuum-package ground hams added 250 ppm EDTA and/or 4 mg LFH/g meat and all of them named EDTA treatment, LFH treatment and LFH+EDTA treatment were stored at 4°C for 0, 2, 4 and 6 days. The thiobarbituric acid reactive substances value (TBARS value) of LFH treatment is the greatest which indicts that LFH has pro-oxidative action. The TBARS value of LFH+EDTA treatment is the lowest. The nonheme iron of LFH treatment is more than control, but LFH+EDTA treatment and control are not significantly different. EDTA treatment is the least. The total plate counts, lactic acid bacterial counts and coliforms in all treatments are lower than control which indict that adding LFH and/or EDTA could inhibit the growth of microbe. In the contrast to control, EDTA treatment, LFH treatment and LFH+EDTA treatment

could decrease 0.62, 0.51 and 0.82 log CFU/g on total plate counts, decrease 0.68, 0.44 and 0.76 log CFU/g on lactic acid bacterial counts, decrease 0.56, 0.24 and 0.64 log CFU/g on coliforms.

The third part is to investigate the microbial properties of non-vacuum-package meat balls added 250 ppm EDTA and/or 4 mg LFH/g meat and all of them named EDTA treatment, LFH treatment and LFH+EDTA treatment were stored at 7°C for 0, 2, 4, 6 and 8 days. The total plate counts in all treatments are lower than control which indicate that adding LFH and/or EDTA could inhibit the growth of microbe. In the contrast to control, EDTA treatment, LFH treatment and LFH+EDTA treatment could decrease 0.16, 0.16 and 0.36 log CFU/g on total plate counts.

Key words: bovine lactoferrin hydrolysate, lactoferricin, antimicrobial peptide, EDTA, meat balls

# 壹、前言

## 前言

乳鐵蛋白 (lactoferrin) 是一種鐵結合性糖蛋白，乳鐵蛋白分子為一條分子量為80 kD的單一胜肽鏈，經折疊後形成二個用來結合鐵離子 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) 位置 (Fe-binding sites) (Bezkorovainy, 1977)。乳鐵蛋白主要分佈於哺乳動物之體液中 (Groves, 1965; Johansson, 1969)，包括母乳、唾液、眼淚及黏膜分泌液。乳鐵蛋白具有許多的生理功能，而乳鐵蛋白的抑菌活性則是它最重要的功能之一 (Reiter, 1983)。

Bellamy (1992b) 等人證實乳鐵蛋白 (lactoferrin; LF) 在胃的酸性pH 下，經胃蛋白酶 (pepsin) 切割後，會從N-terminal region 釋出帶有25 個殘基的抗菌胜肽到腸道中，此釋出的抗菌胜肽就被稱作乳鐵蛋白素 (lactoferricin)，與完整的牛乳鐵蛋白素作比較，發現牛乳鐵蛋白素對多種革蘭氏陰性菌有廣效的的抗菌性 (Yamauchi *et al.*, 1993; Wakabayashi *et al.*, 1999)。且乳鐵蛋白水解物 (lactoferrin hydrolysate; LFH) 的對所有測試菌種的抗菌效果，至少是完整蛋白的8 倍。由此可知，分子量小於6,000 D且具有抗菌活性的小型胜肽，可能比完整的乳鐵蛋白 (分子量為80 KD) 更容易接近菌體表面，所達到的抗菌更佳。但是，當 $\text{Ca}^{2+}$ 及 $\text{Mg}^{2+}$ 的濃度為1-5 mM 時，乳鐵蛋白素的抗菌力會被抑制，而同時使用溶菌酶及乳鐵蛋白水解物，或

溶菌酶、EDTA 及乳鐵蛋白水解物時，會使抗菌作用增強，可以知道抗菌物質間有協同作用（Facon *et al.*, 1995）。我們希望利用抗菌效果更佳，且更具食品加工特性的乳鐵蛋白水解物，作為天然的食品保存劑。

因此本實驗針對乳鐵蛋白的水解液進行加熱來觀察其耐熱性，探討乳鐵蛋白水解液經過加熱是否仍可保有抑制微生物的活性，亦進一步添加於食品系統中，探討EDTA( 250 ppm EDTA )、LFH( 4 mg/g meat 的乳鐵蛋白水解物) 與LFH+EDTA ( 4 mg/g meat 的水解物及250 ppm EDTA ) 冷藏4°C 對豬後腿絞肉與貢丸之TBARS值、非血基質鐵、總生菌數、乳酸菌數及大腸桿菌群數之影響。

## 貳、文獻回顧

## 一、乳鐵蛋白 (lactoferrin; LF) 之簡介

乳鐵蛋白最早是從牛乳中分離出來的 (Sørensen *et al.*, 1939)，因為能與鐵結合 (Grobve, 1960; Masson *et al.*, 1966)，因此被命名為乳鐵蛋白。一般乳鐵蛋白的鐵飽和度會在 15-20%之間，呈部分飽和的狀態，此時乳鐵蛋白的顏色為鮭紅色，隨著鐵飽和度的增加，乳鐵蛋白的顏色則會愈深。鐵飽和度低於 5%的乳鐵蛋白，被稱為 apo-lactoferrin，從母乳中發現的乳鐵蛋白就是屬於此類；而鐵已飽和的乳鐵蛋白，則被稱為 holo-lactoferrin (Steijns *et al.*, 2000)。

過去二十年來，有許多文獻指出乳鐵蛋白具多功能性。在乳鐵蛋白的眾多生理活性當中，最早被提出的是抗微生物活性，之後陸續提出乳鐵蛋白的免疫反應調節功能與其他的細胞功能。近年來，有許多研究團隊使用牛乳鐵蛋白對嬰兒 (Kawaguchi *et al.*, 1989) 與病患 (Yamauchi *et al.*, 2000c; Tanaka *et al.*, 1999; Masci, 2000) 進行臨床試驗。

### (一) 乳鐵蛋白之來源與分佈

乳鐵蛋白主要分佈於哺乳動物之體液中，包括乳汁、唾液、淚液及黏膜分泌物，亦可由發炎反應中活化之嗜中性白血球所釋放 (Groves, 1965; Johansson, 1969)，一般來說，血液中只會含有 1 µg/mL

的乳鐵蛋白，但是當身體產生發炎反應，則血液中的乳鐵蛋白濃度會提高至 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Masson *et al.*, 1971)。表一為乳鐵蛋白在人體內的含量。

乳汁中乳鐵蛋白的含量會受到物種及泌乳期的影響而有所不同 (Steijns *et al.*, 2000)。人類的初乳中含有最豐富的乳鐵蛋白，其含量約為 7  $\text{mg}/\text{mL}$  (Masson *et al.*, 1971)，但到了常乳期，人乳中的乳鐵蛋白含量就只有 1  $\text{mg}/\text{mL}$  左右 (Hennart *et al.*, 1991)。在牛、鼠、馬所分泌的乳汁中，會含有 0.2-2  $\text{mg}/\text{mL}$  不等的乳鐵蛋白 (Shimazaki *et al.*, 1994)，相較之下，山羊乳及豬乳中則含有較低濃度的乳鐵蛋白，平均含量介於 0.02-0.2  $\text{mg}/\text{mL}$  之間 (Reiter, 1978)。

## (二) 乳鐵蛋白之結構與特性

乳鐵蛋白是由單一胜肽鏈摺疊而成醣蛋白，分子量約為 80 kD，且來自不同物種的乳鐵蛋白會含有 1-4 個不等的聚醣 (glycans) (Spik *et al.*, 1994)。牛乳鐵蛋白與人乳鐵蛋白分別由 689 及 691 個胺基酸所組成，而兩種乳鐵蛋白在胺基酸序列上有 69% 的相似度 (Pierce *et al.*, 1991)。

表一、 乳鐵蛋白在人體內的含量。

Table 1. Reported lactoferrin levels in various human secretions and tissues.

| Fluid and tissue   | Level           | MD    |
|--------------------|-----------------|-------|
| Colostrum milk     | 5-7 mg/mL       | —     |
| (preterm)          | 6.76±1.50 mg/mL | RIA   |
| (full-term)        | 3.10±0.50 mg/mL | RIA   |
|                    | 6.7±0.7 mg/mL   | RIE   |
| Transitional milk  | 3.7±0.1 mg/mL   | RIE   |
| Mature breast milk | 1-2 mg/mL       | RIE   |
|                    | 1.97-3.20 mg/mL | RIA   |
|                    | 2.6±0.4 mg/mL   | RIE   |
| Amniotic fluid     | 2-32 mg/mL      | RIA   |
| Bronchial mucus    | 35.2±6.5 mg/mL  | —     |
| Tear fluid         | 2.2 mg/mL       | ELISA |
| Seminal plasma     | 1.18±0.74 mg/mL | RID   |
| Synovial fluid     | 46.4±35.9 mg/mL | —     |

(MD = method of determination; RIA = radioimmunoassay; RID = radial immunodiffusion; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; RIE = rocket immunoelectrophoresis).

(Levay *et al.*, 1995)

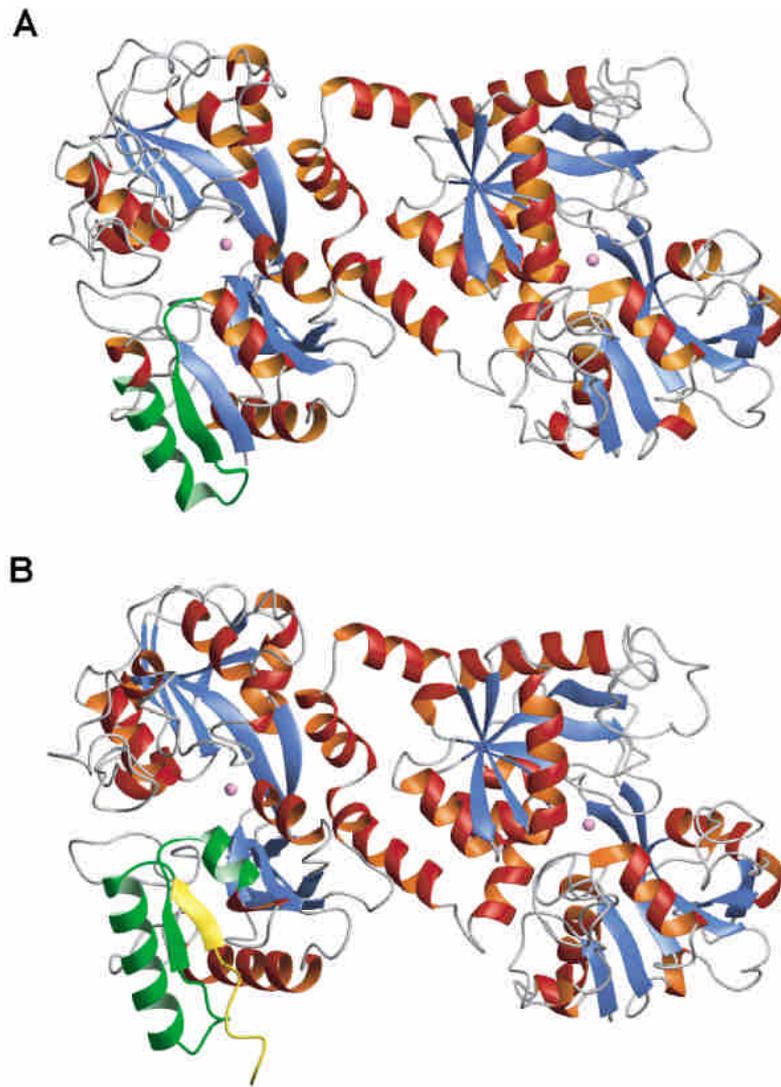
Anderson *et al.* (1989) 與 Moore *et al.* (1997) 分別定出了人乳鐵蛋白與牛乳鐵蛋白的 3-D 構形 (見圖一)；而 Coddeville *et al.* (1992)

與 Spik *et al.* (1994) 則是對來自不同物種之乳鐵蛋白，分別定出連接其上之聚醣結構。人乳鐵蛋白與牛乳鐵蛋白的 3-D 構形十分相似，但並不相同。兩種乳鐵蛋白皆由兩個球葉 (lobes) 所組成，因為兩個球葉分別涵蓋了蛋白分子的 N-端與 C-端，所以分別被稱為 N-球葉與 C-球葉。每個球葉又可進一步的分為兩個次球葉 (sub-lobes) 或是區域 (domains)，即 N1、N2、C1 與 C2 區域。兩個區域之間會形成一個裂縫 (cleft)，該裂縫可以和一分子的鐵離子 (ferric ion;  $\text{Fe}^{3+}$ ) 與一分子的重碳酸根離子 (bicarbonate anion;  $\text{HCO}_3^-$ ) 作緊密的結合。

牛乳鐵蛋白胺基酸序列第 1-90 與第 251-233 的位置會形成 N1 區域，第 91-250 的位置會形成 N2 區域，第 345-431 與第 593-676 的位置會形成 C1 區域，而第 432-592 的位置會形成 C2 區域；第 334-344 的位置會形成一個紐結 (hinge)，該紐結為一帶有三個轉折的螺旋構形，可以決定區域的開合。存在於裂縫中且能與鐵離子結合的胺基酸，在 N-球葉的為 Asp60、Tyr92、Tyr192 與 His253 (見圖二)，在 C-球葉的為 Asp395、Tyr433、Tyr526 與 His595，而存在於兩球葉中的重碳酸根離子則扮演協助牛乳鐵蛋白結合鐵離子的角色 (Moore *et al.*, 1997; Haridas *et al.*, 1995)。乳鐵蛋白除了能與鐵離子結合之外，尚可與  $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{3+}$ 、 $\text{Co}^{3+}$ 、 $\text{Ga}^{3+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  等多價金屬離子結合 (Ainscough *et al.*, 1979; Cochran *et al.*, 1984)，但是對鐵的親合力為最

高 ( $K_a$  值約為  $10^{20}$ ) (Baker *et al.*, 1994)。又乳鐵蛋白螯合鐵的能力會受到 pH 值的影響，Feng *et al.* (1995) 發現乳鐵蛋白在  $pH > 7$  時，幾乎不會將鐵釋放出來，當漸漸調降 pH 值至 5.5 時，則約有 80% 的鐵會被釋放出來；但是另有研究指出，乳鐵蛋白在 pH 5.5 時，幾乎不會將鐵釋放出來，且在中性條件下，乳鐵蛋白螯合鐵與釋放鐵的過程非常緩慢 (Pakdaman *et al.*, 1998)，而在  $pH < 3.5$  時，乳鐵蛋白會非常快速的將鐵釋放出來，此時乳鐵蛋白的構形為展開狀 (Abdallah *et al.*, 2000)。

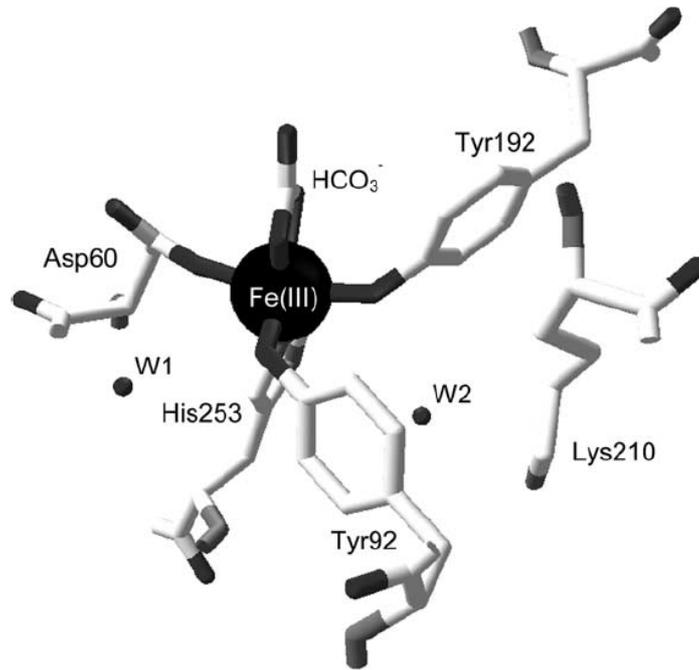
乳鐵蛋白的鐵結合位置及整體結構都與血漿中的運鐵蛋白相似 (Baker *et al.*, 2002)，然而兩者主要的不同點在於它們的 N-端區域。乳鐵蛋白的 N-端區域因為富含精胺酸及離胺酸殘基，所以帶有強鹼性，而運鐵蛋白的 pI 則在 5.9 左右 (Baker *et al.*, 2002)。就理論值而言，人乳鐵蛋白與牛乳鐵蛋白的 pI 分別為 9.5 與 9.4；但就實際值（實驗值）來說，牛乳鐵蛋白的 pI 約為 8 左右，而人乳鐵蛋白的 pI 則介於 5.5 到 10 之間，變化相當大 (Shimazaki *et al.*, 1993)。VanBerkel (1998) 推測這樣的變化可能是由於在生產人乳鐵蛋白時，分離條件有所不同，以致於在分子的 N 端會含有不等量的精胺酸。



圖一、 (A) 牛及 (B) 人乳鐵蛋白之3-D結構。只有顯示出二級骨架結構；藍色部分為 $\beta$ -摺板，而紅色與橘色部分則為 $\alpha$ -螺旋。牛及人乳鐵蛋白素的部分有綠色及黃色的標記。

Fig. 1. 3-D structures of (A) bovine and (B) human lactoferrin. Only the secondary backbone structure is shown; blue represents  $\beta$ -sheets and red and orange represent  $\alpha$ -helices. The portions for lactoferricin B and H are highlighted in green and yellow.

(Vogel *et al.*, 2002)



圖二、牛乳鐵蛋白N-球葉之三價鐵結合位置。

Fig. 2. Stick model of the environment of the Fe(III) ion in the N-lobe of bovine Lf (PDB ID code: 1BLF). The W1 and W2 water molecules are represented by small spheres. The W1 and W2 water molecules are at 3.95 and 4.27 Å from to iron (Fe–O distance), respectively.

(Fasano *et al.*, 2004)

在牛乳鐵蛋白中有五個位置能與 N 端連接之多醣結構 (N bound glycan structures) 進行鍵結，即 Asn233、Asn281、Asn368、Asn476 及 Asn545。但是化學分析後的結果卻只發現四個 N 端連接之多醣，似乎 Asn281 並沒有被使用到，而 Asn476 則會根據物種的不同而具有保留性。在牛乳鐵蛋白中已經發現有 N-乙醯乳糖胺 (N-acetyllactosamine)、N-乙醯葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine)、半乳糖 (galactose)、岩藻糖 (fucose)、甘露糖 (mannose) 與神經胺酸 (neuraminic acid) 等糖類存在 (Spik *et al.*, 1994)。

### (三) 乳鐵蛋白之生產與應用

目前，自起士乳清與脫脂奶中分離純化出來的乳鐵蛋白量已達工業規模，全球每年約生產 20-30 噸的乳鐵蛋白。每升的起士乳清中約還有 100 mg 的乳鐵蛋白。因為乳鐵蛋白是以帶正電的方式存在於乳清當中，因此，可以利用陽離子交換樹脂去吸附乳清當中的乳鐵蛋白，之後再以鹽溶液將乳鐵蛋白自樹脂上沖提下來。將所得之粗乳鐵蛋白以超過濾與薄膜過濾的方式進行脫鹽與濃縮後，再進行滅菌。最後經由冷凍乾燥所得乳鐵蛋白粉末的純度可達 95% 以上。另外，也可以使用微過濾與噴霧乾燥來作為滅菌與冷凍乾燥的加工替代方案 (Tomita *et al.*, 2002)。Abe *et al.* (1991) 發現乳鐵蛋白在中性或鹼性條

件 (pH 6-10) 下進行加熱處理，會造成蛋白質變性，但若是在酸性條件下進行加熱處理，乳鐵蛋白則仍然維持穩定。因此，在 pH 4 左右對乳鐵蛋白溶液進行 90-100°C、5-10 分鐘的加熱處理，或是先將乳鐵蛋白溶液置於 70°C 下預熱 3 分鐘，接著在 130°C 下進行 2 秒鐘的超高溫瞬間殺菌處理 (ultrahigh temperature; UHT)，兩者都適合作為乳鐵蛋白的滅菌方法。目前，該滅菌程序已經取得專利，並廣泛的應用在含乳鐵蛋白商品之生產製造上。

純化後的乳鐵蛋白經安全試驗後，證實其毒性非常低。以單一劑量 (2000 mg · Kg<sup>-1</sup> · day<sup>-1</sup>) 對兩種性別的大鼠進行 4 周及 13 周的口服毒性試驗 (oral toxicity tests)，發現不會讓大鼠產生不良的反應 (Yamauchi *et al.*, 2000a)。此外，Yamauchi *et al.* (2000b) 對乳鐵蛋白進行微生物回復突變試驗 (bacterial reverse-mutation test)，發現乳鐵蛋白不具任何致突變性。根據這些安全測試與臨床研究的結果可知，純化之乳鐵蛋白可以作為一種具有高度安全性的食品添加物。

目前，市售食品中有添加乳鐵蛋白的，包括添加乳鐵蛋白之嬰兒奶粉、較大嬰兒奶粉 (follow-up milk)、脫脂牛奶、優酪乳 (yogert)、口香糖以及一些營養補充品。乳鐵蛋白除了可以添加到食品當中，也可以應用在化妝品、水產養殖飼料 (aquaculture feed)，以及貓狗發炎

時的治療性飲食 (therapeutic diet) 中 (Tomita *et al.*, 2002)。

Naidu (2001) 發展出一套系統來將乳鐵蛋白固定化到食品級的多醣上，當多醣溶解於含氯化鈉的檸檬酸鹽/重碳酸鹽緩衝液 (citrate/bicarbonate buffer with NaCl) 中，就會釋出乳鐵蛋白。這項名為 “Activated Lactoferrin™ (Activin™)” 的產品可以有效的抑制住菌體的生長與附著，並獲得美國食品藥物管理局 (the Food and Drug Administration; FDA) 與美國農業部 (U.S. Department of Agriculture; USDA) 的核准，用於防止新鮮牛肉受到微生物的污染 (Naidu, 2002)。

#### (四) 乳鐵蛋白之生理活性

乳鐵蛋白具有許多的生理功能，像是能抗菌 (Reiter, 1983)，調節鐵的吸收 (Fransson, 1983)，為淋巴球的生長促進因素 (Hashizume *et al.*, 1983)，巨噬細胞、顆粒球及嗜中性白血球的產物調節 (Ambruso *et al.*, 1981; Broxmeyer *et al.*, 1980; Johansson, 1969)，以及為比菲德氏菌 (*Bifidobacterium*) 的生長促進因素 (Kodama, 1983)，而乳鐵蛋白的抑菌活性則是它最重要的功能之一。

##### 1. 抗微生物活性

## 1.1. 抗菌活性

乳鐵蛋白已經被證實能抑制多種革蘭氏陰性菌（如*Escherichia coli*、*Salmonella enteritidis*、*Pseudomonas aeruginosa*）、革蘭氏陽性菌（如*Staphylococcus aureus*、*Listeria monocytogenes*、*Bacillus subtilis*）、真菌（如*Candida albicans*、*Cryptococcus uniguttulatus*）及好氧菌（aerobes）、厭氧菌（anaerobes）與酵母菌（yeast）（Weinberg, 1984）。

鐵未飽和之乳鐵蛋白（apo-lactoferrin; apo-LF）除了能減少微生物對鐵的利用外，亦可阻斷微生物對碳水化合物的代謝。當加入溶菌酶（lysozyme）或免疫球蛋白（IgA）時，會提高乳鐵蛋白的抗微生物活性（Balmer *et al.*, 1989）。Payne *et al.* (1990) 研究牛乳鐵蛋白和 apo-LF 在含有 2% 脂肪的超高溫滅菌（ultra high temperature sterilization; UHT）牛乳中對*Listeria monocytogenes* 生長的影響，結果顯示在牛乳中加入乳鐵蛋白（鐵飽和度約 52%）可以抑制*L. monocytogenes* 的生長，加入 apo-LF 時，對*L. monocytogenes* 則有靜菌作用。另外，在含有 apo-LF 的牛乳中加入 ferric ammonium citrate，使 apo-LF 轉變成鐵飽和的狀態，結果發現 apo-LF 的靜菌作用被徹底破壞，因而得知乳鐵蛋白的抗菌表現與其鐵飽和度及其濃度有關。Payne *et al.* (1994) 將 EDTA 或 apo-LF 結合溶菌酶應用在超高溫巴斯德殺菌

之牛乳來抵抗*Pseudomonas fluorescens*、*Salmonella typhimurium*、*Escherichia coli* O157:H7及*Listeria monocytogenes*，結果發現不論單獨使用EDTA、apo-LF或溶菌酶，或是結合在一起使用，都不會影響*P. fluorescens*與*S. typhimurium*的生長。

有研究指出乳鐵蛋白能有效抑制大腸桿菌生長的最低濃度為25  $\mu\text{M}$ ，但隨著環境中鐵離子濃度的增加，乳鐵蛋白會逐漸喪失其抑菌作用（曹，1999），原因推測如下：(1) 乳鐵蛋白的抗菌作用可能是透過與大腸桿菌競爭環境中的鐵離子，使大腸桿菌因無法獲得鐵離子作為養分來源而無法生長。當環境中有過量的鐵離子時，在乳鐵蛋白皆達到鐵飽和狀態之後，大腸桿菌仍可從環境中獲得足夠的鐵離子供其正常生長之用；(2) 乳鐵蛋白與鐵離子結合後，其三級結構會改變，這種結構上的改變可能會導致乳鐵蛋白的抗菌區域無法表現，使得乳鐵蛋白的抗菌作用受到影響。Ellison *et al.* (1991) 發現乳鐵蛋白會直接破壞革蘭氏陰性菌的外膜，導致細胞外膜脂多醣體 (lipopolysaccharide; LPS) 的釋放，並且提升細菌對於疏水性抗生素及溶菌酶的敏感度。然而，這二種作用會受到 $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{Mg}^{2+}$ 的抑制 (Ellison *et al.*, 1990)。先前的研究亦指出，環境中的死菌會使乳鐵蛋白的抗菌表現降低或消失 (Ellison *et al.*, 1988)。

Klebanoff *et al.* (1990) 發現  $\text{Fe}^{2+}$  和 apo-LF 可以  $\text{H}_2\text{O}_2$  為媒，生成氫氧自由基 (hydroxy radicals;  $\cdot\text{OH}$ ) 對 *E. coli* 產生毒性，並假設此作用會抑制微生物生長。另外，Bortner *et al.* (1986; 1989) 指出二價陽離子會高度影響乳鐵蛋白的抗菌活性，乳鐵蛋白對於 *Legionella pneumophila* 具有抗菌活性，當有氯化鈣、硝酸鎂及氯化鎂存在時，乳鐵蛋白的抗菌作用會降低，但氯化鈉的存在則無此影響。

### 1.1.1. 兩大抗菌區域—乳鐵蛋白素與 lactoferrampin

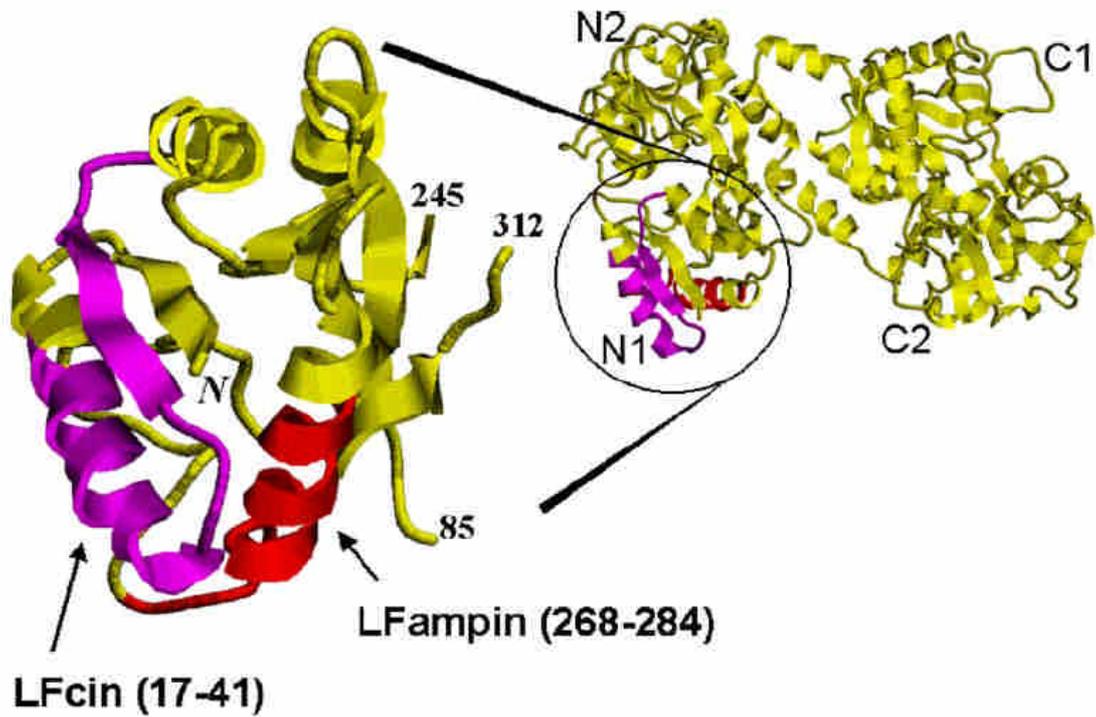
牛乳鐵蛋白 (bovine lactoferrin; bLF) 是一個具有多功能性的蛋白質，它含有兩個抗菌區域，即牛乳鐵蛋白素 (bovine lactoferricin; LFcic B) (Tomita *et al.*, 1991) 與 lactoferrampin (LFampin) (van der Kraan *et al.*, 2004) (見圖三)。牛乳鐵蛋白素是由牛乳鐵蛋白第17-41個胺基酸殘基所組成，其二級結構為含有一個雙硫鍵的扭曲 $\beta$ -摺板 (Vogel *et al.*, 2002)。牛乳鐵蛋白素具有廣泛的抗細菌、抗真菌及抗病毒的能力 (Seganti *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 1998; Wakabayashi *et al.*, 1996; Yamauchi *et al.*, 1993)。根據牛乳鐵蛋白素合成之衍生胜肽，儘管少了一個雙硫鍵，仍可殺死具有代表性的菌株，包括 *Candida albicans* 及 *Escherichia coli* (Groenink *et al.*, 1999; Rekdal *et al.*, 1999; Van der Kraan *et al.*, 2004)。

第二個抗菌區域—LFampin 對於酵母菌 *C. albicans* 及一些細菌會有抗菌效果 (van der Kraan *et al.*, 2004)。除了 LFampin 268-284 之外，尚有一系列較長或較短的 LFampin 衍生胜肽被人研究 (van der Kraan *et al.*, 2005)。從研究結果可以很明顯的發現，LFampin 265-284 這段胜肽序列比 LFampin 268-284 具有更容易形成  $\alpha$ -螺旋結構，而且 LFampin 265-284 除了會對酵母菌展現更強的抗菌活性之外 (Vogel *et al.*, 2002)，還會殺死對 LFampin 268-284 不敏感的革蘭氏陽性菌 (van der Kraan *et al.*, 結果未發表)。

這兩個抗菌區域的抗菌作用模式尚未建立。牛乳鐵蛋白素會使感性細菌的生物膜失去極性，但不會破壞生物膜的組成 (Ulvatne *et al.*, 2001)，也有研究指出牛乳鐵蛋白素會對 *E. coli* 及 *S. aureus* 的胞內物質作用 (Haukland *et al.*, 2001)，然而，LFampin 對生物膜的作用至今仍然無人提出。

## 1.2. 抗真菌活性

Fluconazole 已被證實能夠殺死許多臨床上分離出來的念珠菌 (*Candida species*)。Kuipers *et al.* (1999) 將乳鐵蛋白與 fluconazole 結合使用，發現乳鐵蛋白可以降低 fluconazole 的最小抑菌濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC)，這表示將乳鐵蛋白與抗真菌劑併用，



圖三、牛乳鐵蛋白的N1-區域。

Fig. 3. Ribbon diagram of the N1-domain of bovine lactoferrin. Positioned in close proximity to lactoferricin (LFcic: amino acids 17-41) within the N1-domain of lactoferrin, a novel antimicrobial domain has been identified and referred to as lactoferrampin (LFampin, amino acids 268-284). The figure was constructed using RasWin Molecular graphics (Protein Data Bank accession code 1BLF).

(van der Kraan *et al.*, 2004)

也許能治療由抗藥性念珠菌所引起的感染現象。乳鐵蛋白與目前已經被使用的抗生素、抗真菌劑及抗菌劑，具有協同作用 (synergistic action)，能夠增加這些藥劑的效用 (Ellison *et al.*, 1991; Naidu *et al.*, 1994; Wakabayashi *et al.*, 1996; 1998)。因此，合併使用乳鐵蛋白與抗真菌劑來治療由念珠菌所引起的嚴重感染，便成為一項引人的選擇。也有研究結果顯示，人乳鐵蛋白能增強多型核白血球 (polymorphonuclear leukocyte; MPN) 對 *C. albicans* 的吞噬作用，而具有部分抗真菌的能力 (Palma *et al.*, 1992)。

### 1.3. 抗病毒活性

人乳鐵蛋白可能藉由影響病毒之吸附以及穿透作用，而抑制人類免疫不全病毒 (human immunodeficiency virus; HIV)、巨細胞病毒 (cytomegalovirus) (Harmsen *et al.*, 1995) 以及皰疹病毒 (herpes simplex virus; HSV) (Fuhihara *et al.*, 1995) 感染細胞株。而預先局部投予 1% 牛乳鐵蛋白溶液亦被證實可有效預防小鼠角膜 (cornea) 感染皰疹病毒 (Fuhihara *et al.*, 1995)。

### 1.4. 抗寄生蟲活性

關於乳鐵蛋白抗寄生蟲疾病這方面的報告較少，Tanaka *et al.* (1996) 指出乳鐵蛋白除能抑制微生物生長外，亦能抵抗寄生蟲入侵

細胞。Omata *et al.* (2001) 也觀察到在 *Toxoplasma gondii* 和 *Eimeria stiedai* sporozoites 的潛伏期下，來自牛乳鐵蛋白的胜肽可以使感染減弱，推測可能是由胜肽直接作用於寄生蟲的細胞膜，或是因為與寄主組織作用而達影響。另一方面，亦有研究指出乳鐵蛋白對 *Pneumocystis carinii* 有抗寄生蟲的活性，可能原因為破壞寄生蟲之鐵吸收代謝作用 (Cirioni *et al.*, 2000)，但也有相反的結果發現乳鐵蛋白對於一些寄生蟲也會有正面的幫助，如 *Tritrichomonas foetus* (Tachezy *et al.*, 1996)，這結果類似乳鐵蛋白對於一些病原細菌的作用，如 *N. meningitidis*，可能是細菌可利用外膜上之蛋白質來獲得乳鐵蛋白或運鐵蛋白所結合的鐵。

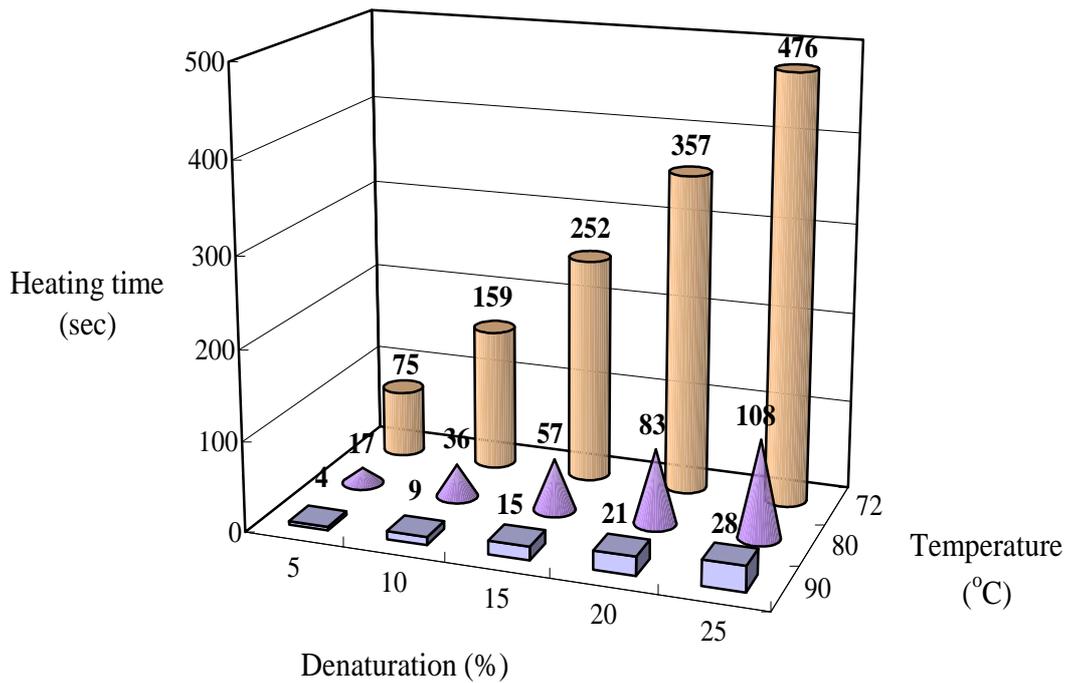
#### (五) 乳鐵蛋白之加工特性 (熱穩定性)

Paulsson *et al.* (1993) 使用鐵不飽和之牛乳鐵蛋白 (bovine apolactoferrin; apo-bLF) 與鐵飽和之牛乳鐵蛋白 (bovine hololactoferrin; holo-bLF) 進行加熱處理，探討兩種牛乳鐵蛋白之熱穩定性，與加熱前後兩種牛乳鐵蛋白之抗菌表現，以及與細菌之交互作用。研究發現這兩種牛乳鐵蛋白在 72°C 下進行 15 秒鐘的巴斯德低溫滅菌處理 (pasteurization) 後，不會影響其抗菌表現；然而，當牛乳鐵蛋白在 135°C 下進行 4 秒鐘的超高溫瞬間殺菌處理後，holo-bLF 與

細菌的結合能力，以及 apo-bLF 的靜菌能力 (bacteriostatic activity) 都會下降。Sanchez *et al.* (1992b) 將這兩種牛乳鐵蛋白分別在 72°C 與 85°C 下進行加熱變性，結果顯示 apo-bLF 的變性速度會比 holo-bLF 快；而溶於磷酸緩衝液的牛乳鐵蛋白會比溶於牛乳的牛乳鐵蛋白更容易變性。Sanchez *et al.* (1992b) 為此下了一個結論，即乳品工業上使用之巴斯德低溫滅菌並不會影響乳鐵蛋白的結構。Luf *et al.* (1997) 也提出相同的結論。而牛乳鐵蛋白的熱穩定性會受到環境的影響，包括 pH 值、鹽類與蛋白質 (Kussendrager, 1994)。圖四為溶於 0.1% 磷酸緩衝液的牛乳鐵蛋白 (pH 6.5) 在不同溫度 (72、80 或 90°C) 處理下之變性情形 (Kussendrager, 1994)。

## 二、乳鐵蛋白水解物

Bellamy *et al.* (1993) 發現當環境中有鐵離子存在時，會降低乳鐵蛋白的抗菌效果，但不會影響乳鐵蛋白素的抗菌效果，證明乳鐵蛋白是利用與細菌競爭環境中的鐵而產生抑菌效果，必須在進入動物體並經酵素水解後，釋出乳鐵蛋白素，才能表現出完整的殺菌能力。在動物體內僅有 2-6% 的乳鐵蛋白可以完整的通過胃而進入小腸，絕大部分的乳鐵蛋白會被分解成乳鐵蛋白素及其他小的胜肽片段 (Kuwata *et al.*, 1998)。



圖四、 加熱對牛乳鐵蛋白變性之影響。此圖列出將 1%牛乳鐵蛋白 (溶於 10 mM 且 pH 值為 6.5 的磷酸鈉緩衝液) 經不同溫度 (72、80 或 90°C) 處理後，達到不同變性程度 (5、10、15、20 或 25%) 所需的加熱時間 (秒)。

Fig. 4. Effect of heating on denaturation of bovine lactoferrin. The figure lists the heating times (sec) which give either 5, 10, 15, 20 or 25% denaturation of 0.1% bovine lactoferrin in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) at temperatures of 72, 80 or 90°C.

(Kussendrager, 1994)

Tomita *et al.* (1991a, b) 與 Hoek *et al.* (1997) 分別使用了不同的方法來水解牛乳鐵蛋白，所得之水解產物皆具有優於牛乳鐵蛋白的抗菌活性，且有許多研究結果顯示，乳鐵蛋白水解物與許多物質具有協同抗菌作用，茲介紹如下。

### (一) 乳鐵蛋白之酸水解物

Tomita *et al.* (1991a) 將牛乳鐵蛋白在由不同的酸鹼值 (pH 1-4)、加熱溫度 (60-130°C) 與加熱時間 (5-60 分鐘) 所組成之 96 種條件下進行水解，發現乳鐵蛋白在 pH 2.0 或 3.0 條件下，進行 100°C 以上的加熱處理，其抗菌性會比完整的乳鐵蛋白強。如果加熱溫度降低至 80°C 或 90°C 時，則加熱時間需要延長至 60 分鐘，如此得到的水解產物才會具有強的抗菌性。而該水解產物的抗菌活性與其水解率有關，當水解產物的水解率達 10% 時，具有最強的抗菌效果。

Tomita *et al.* (1991a) 將牛乳鐵蛋白在 pH 2.0 下進行 120°C、15 分鐘的加熱處理 (水解率為 10%)，所得水解產物在液態培養基中的濃度為 10 µg/mL 時，具有抗菌效果。Tomita *et al.* (1991a) 並用反相高效液相層析管柱 (reversed phase-high performance liquid chromatographic; RP-HPLC) 去分離水解產物，發現其中有一些肽類分離物具有強的抗菌活性，這說明了乳鐵蛋白潛藏了一個以上的抗菌

區域，當乳鐵蛋白經過有限的酸水解處理後，這些抗菌區域會被釋出，並且被激化。該水解產物在含鐵的培養基中，能持續發揮其抗菌活性，加上該水解產物已經不再具有與鐵結合的能力，與乳鐵蛋白的抗菌機制相比照，可以發現乳鐵蛋白胜肽片段的抗菌活性與鐵的螯合無關。

## (二) 乳鐵蛋白之胃蛋白酶水解物 (pepsin-hydrolyzed LF)

Tomita *et al.* (1991b) 於 pH 2.5、37°C 的條件下，使用豬的胃蛋白酶 (porcine pepsin) 對牛乳鐵蛋白進行 4 個小時的水解反應，所得水解產物除了能廣泛的對革蘭氏陽性菌與革蘭氏陰性菌產生抗菌效果外，其抗菌能力也比乳鐵蛋白高出 9-25 倍。此外，相較於乳鐵蛋白的靜菌表現，乳鐵蛋白水解物更具有殺菌的效果。Tomita *et al.* (1991b) 並於水解過程中，每隔 30 分鐘收集一次水解產物，將水解產物以 SDS-PAGE 分析後發現，酵素水解反應會在 30 分鐘內進行完全。經胃蛋白酶切割 30 分鐘後，所得到之小分子水解產物 (分子量小於 6 kD) 在濃度  $\geq 0.25$  mg/mL 時，可以完全抑制 *E. coli* O111 的生長。經胃蛋白酶切割 4 個小時後，所得水解產物的最小抑菌濃度 (minimal inhibitory concentration; MIC) 也是 0.25 mg/mL。這表示就算拉長了水解反應的時間，所得之水解產物依然保有其抑菌活性，又水

解物對 *E. coli* O111 的殺菌效果是立即性的 (Tomita *et al.*, 1991b)。儘管有些菌種可以抗完整的牛乳鐵蛋白，但是水解物卻可以抗所有革蘭氏陰性菌 (*Bacillus*, *Listeria*, *Streptococcus*) 及革蘭氏陽性菌 (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Pseudomonas*) 的測試菌種，且水解物的對所有測試菌種的抗菌效果，為完整蛋白的 8 倍以上 (見表二)。由此可知，分子量小於 6 kD 且具有抗菌活性的小型胜肽，可能比完整的乳鐵蛋白 (分子量約為 80 kD) 更容易接近菌體表面，而達到的更佳的抗菌效果。

牛乳鐵蛋白的水解物經過 80°C、15 分鐘的處理，中止水解反應後，仍保有其抗菌活性，這表示水解物對熱是相當穩定的 (Tomita *et al.*, 1991)。將水解物的 pH 先調整成 11 (未經加熱再處理)，再調回中性時，水解物的抗菌效果會損失 50% 左右 (見表三)。這是因為水解物的部分組成在鹼性條件下會變得不溶解，並形成結塊而失活。水解物在 pH 3-7 的條件下，經過 121°C、15 分鐘的加熱再處理後，當它再次被調成中性時，水解物的抗菌活性仍被保留 (Tomita *et al.*, 1991b)。由上述可知，乳鐵蛋白水解物可以加熱滅菌。相反地，完整的乳鐵蛋白在 pH 6.0 的條件下，經過 100°C、5 分鐘的加熱處理後，就會完全失去其抗菌效果 (Abe *et al.*, 1991)。水解物的水溶液在 pH 3-7 的條件下，可以冷藏三個月以上而不會喪失其抗菌性 (Tomita *et*

*al.*, 1991b)。

Tomita *et al.* (1991b) 並將所得之水解物以反相高效液相層析管柱進行分離，發現只有一個 peak 具有抗菌效果。將這個具有抗菌活性的分離液以 SDS-PAGE 分析，發現裡面含有數種胜肽。而 Bellamy *et al.* (1992b) 證實乳鐵蛋白在胃的 pH 值下，經胃蛋白酶切割後，會從乳鐵蛋白的 N1 區域釋出帶有 25 個胺基酸殘基的抗微生物胜肽到腸道中，該段胜肽即為乳鐵蛋白素<sup>TM</sup> (lactoferricin<sup>TM</sup>)，而乳鐵蛋白與乳鐵蛋白素無論是在有機體外 (*in vitro*) 或是在有機體內 (*in vivo*)，皆具有許多不同的生理活性。由此可知，在乳鐵蛋白的水解物中會含有乳鐵蛋白素。

Dionysius *et al.* (1997) 從胃蛋白酶處理所得之牛乳鐵蛋白水解物中，亦分離出三種抗腸毒素型大腸桿菌 (*Enterotoxigenic Escherichia coli*; ETEC) 的胜肽，分別命名為 peptide I、peptide II 及 peptide III (見圖五)。三種胜肽皆帶正電且都來自牛乳鐵蛋白的 N 端，而具有殺菌活性的牛乳鐵蛋白素就是位於這個位置。

Peptide I 來自於牛乳鐵蛋白第 17 到第 42 個胺基酸殘基，其 C 端處只比 Bellamy *et al.* (1992) 發現的牛乳鐵蛋白素 (bovine lactoferricin; LFcIn B) 多了一個丙胺酸 (alanine)，分子量為 3195 Da，

是三種胜肽中抗 ETEC 活性最強的，以莫耳濃度來看，peptide I 抗 ETEC 的活性是完整牛乳鐵蛋白的三倍，*Listeria monocytogenes* 對 peptide I 最敏感，而 *Pseudomonas fluorescens* 及 *Staphylococcus aureus* 對 peptide I 的抗性最強。然而，無論是腸毒素型大腸桿菌、食物腐敗菌 (*P. fluorescens*) 或是食物病原菌 (*L. monocytogenes*, *Bacillus cereus* 及 *Salmonella salford*)，它們的生長情形皆可被 peptide I 以相當低的濃度抑制住。

Peptide II 抗 ETEC 的表現是三種胜肽當中最差的，由兩段序列 (來自於牛乳鐵蛋白第 1 到第 16 及第 43 到第 48 個胺基酸殘基) 透過一個雙硫鍵結合而成，分子量為 2673 Da。

Peptide III 也是含有一個雙硫鍵的混合雙體 (heterodimer)，來自於牛乳鐵蛋白第 1 到第 48 個胺基酸殘基，但是在第 42 與第 43 個胺基酸殘基之間的胜肽鍵是被切斷的，分子量為 5851 Da。在結構上，peptide III 與 Bellamy *et al.* (1992) 發現的人乳鐵蛋白素有同源性。Peptide III 對 ETEC 的抗性比 peptide I 低了四倍，而人乳鐵蛋白素 (Bellamy *et al.*, 1992) 的抗菌活性則比牛乳鐵蛋白素低了九倍。

表二、 牛乳鐵蛋白及其胃蛋白酶水解物的抗菌表現。

Table 2. Antibacterial activity of bovine lactoferrin and pepsin-hydrolyzed lactoferrin against various bacterial species.

| Bacterial strain <sup>1</sup>          | MIC <sup>2</sup> (mg/mL) |             |
|--|--------------------------|-------------|
|  | Lactoferrin              | Hydrolysate |
| <i>Escherichia coli</i> IID-861        | 2.0                      | 0.23        |
| <i>Salmonella enteritidis</i> IID-604  | > 8.0                    | 0.32        |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> JCM-1662T | > 8.0                    | 0.47        |
| <i>Proteus vulgaris</i> JCM-1668T      | > 8.0                    | 0.94        |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MMI-603  | > 8.0                    | 0.63        |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC-6633     | 1.6                      | 0.08        |
| <i>Streptococcus bovis</i> JCM-5672    | 1.6                      | 0.08        |
| <i>Listeria monocytogenes</i> IDF-1b   | 1.6                      | 0.08        |

<sup>1</sup>The IID denotes Institute of Infectious Disease (now Institute of Medical Science) at Tokyo University, Tokyo, Jpn; JCM denotes Japan Collection of Microorganisms at RIKEN, Wako City, Jpn; MMI denotes Morinaga Milk Industry Co. Ltd., Zama City, Jpn; ATCC denotes American Type Culture Collection, Rockville, MD; IDF denotes International Dairy Federation, Tokyo, Jpn.

<sup>2</sup>MIC = Minimal inhibitory concentration. Lactoferrin was assayed at concentration of 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 and 8.0 mg/mL. Lactoferrin hydrolysate was assayed at 0, 0.04, 0.08, 0.16, 0.23, 0.32, 0.47, 0.63, 0.94, 1.2 and 1.6 mg/mL. The MIC values indicated were observed in three experiments.

(Tomita *et al.*, 1991b)

表三、 不同pH值之乳鐵蛋白水解物經高溫高壓加熱處理後對  
*Escherichia coli* O111的抗菌表現。

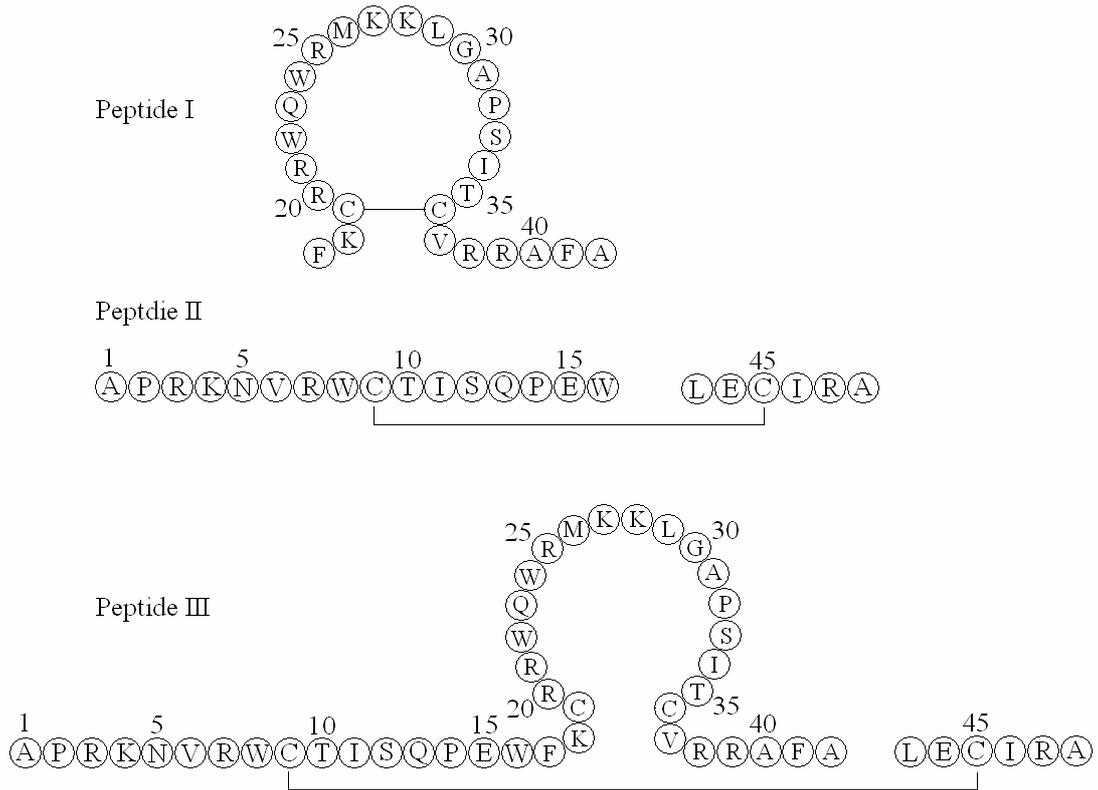
Table 3. Antibacterial activity of lactoferrin hydrolysate against  
*Escherichia coli* O111 after pH adjustment and autoclaving.

| Treatment <sup>1</sup> | MIC <sup>2</sup> (mg/mL) |      |      |      |       |
|------------------------|--------------------------|------|------|------|-------|
|                        | pH 3                     | pH 5 | pH 7 | pH 9 | pH 11 |
| Unheated hydrolysate   | 0.25                     | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.50  |
| Autoclaved hydrolysate | 0.25                     | 0.25 | 0.25 | 0.50 | 1.00  |

<sup>1</sup>Lactoferrin hydrolysate (16 mg/mL in 1 % peptone) was adjusted to various pH conditions as indicated by addition of 1 N NaOH or 1 N HCl and held at room temperature (unheated control) or autoclaved at 121 °C for 15 min. Antibacterial activity was assayed after neutralizing the solutions.

<sup>2</sup>MIC = Minimal inhibitory concentration. Hydrolysates were assayed at 0, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.30 and 1.60 mg/mL. The MIC values indicated were observed in two experiments.

(Tomita *et al.*, 1991b)



圖五、牛乳鐵蛋白之胃蛋白酶水解物中所含抗菌胜肽之主要序列。  
 胺基酸殘基旁的數字表示該殘基在牛乳鐵蛋白中的序列位置；直線部分為雙硫鍵。

Fig. 5. Primary sequences of antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. Residue numbers indicate sequence position in bovine lactoferrin, and disulfide bonds are shown as lines.

(Dionysius *et al.*, 1997)

### (三) 乳鐵蛋白之凝乳酶水解物 (chymosin-hydrolyzed LF)

Hoek *et al.* (1997) 在 pH 3.0、60°C 下以重組之凝乳酶 (recombinant chymosin) 水解乳鐵蛋白，產生具有抗菌活性的水解產物，並使用一步離子交換分離法 (single-step ion-exchange fractionation) 從水解物中分離出胜肽混合物，該混合物與 Bellamy *et al.* (1992) 所定之牛乳鐵蛋白素完全相同或近乎相同。若在稍高的 pH 下以凝乳酶水解 apo-LF，則會產生兩個大的、具抗菌活性的 N 端片段，即 LF 1-106 與 LF 1-92，而這兩片段的抗菌活性 (MIC 為 160 mg/mL; 13 mM) 幾乎與完整的乳鐵蛋白一致 (MIC 為 1 mg/mL; 12.5 mM)。

Shimazaki *et al.* (1991) 在生理的 pH 下以凝乳酶水解乳鐵蛋白，發現在生產起士期間，不大可能會有抗菌胜肽經凝乳酶水解產生。所有在凝集期間之蛋白質降解反應一定會受  $\kappa$ -酪蛋白 ( $\kappa$ -casein) 的單一位置影響 (Delfour *et al.*, 1965)。然而，當能夠消化乳鐵蛋白的酸與哺乳動物腸內的酵素在體外相結合時，就能夠產生乳鐵蛋白素。為證實此點，Tomita (1994) 以乳鐵蛋白飼養大鼠，並從大鼠之排泄物中分離出牛乳鐵蛋白素，這表示乳鐵蛋白其中一個生理功能就是作為具抗菌活性之乳鐵蛋白素的前趨物。

從起士乳清中 (Dionysius *et al.*, 1991) 或是透過發酵 (Ward *et*

al., 1995) 都可以大規模的生產乳鐵蛋白。因為凝乳酶是一個既便宜又可立即取得之 aspartic proteases 取代品，因此在酸性條件下以凝乳酶水解乳鐵蛋白，生產具抗菌活性之水解產物似乎很合理，而用來純化乳鐵蛋白的技術亦能用來大量分離並純化具抗菌活性之肽。

#### (四) 協同抗菌作用 (synergistic effect)

Facon *et al.* (1995) 發現單獨使用溶菌酶時，對 *Salmonella enteritidis* 並沒有產生靜菌作用。在不添加乳鐵蛋白水解物及溶菌酶，只增加 EDTA 濃度的情況下，儘管抗菌效果不大，但 *S. enteritidis* 的菌數呈現連續性的減少。當 EDTA 濃度為 0.25 mM 時，會表現出有限的靜菌作用，隨著 EDTA 濃度增加，其抗菌效果也會稍微的增加。當 EDTA 濃度為 1.25 mM，並與乳鐵蛋白水解物 (30 µg/mL) 及溶菌酶 (80 µg/mL) 並用，可以防止接種菌數的增加，並降低 *S. enteritidis* 的一個 log CFU/mL。單獨使用乳鐵蛋白水解物時，對 *S. enteritidis* 只會表現出有限的靜菌作用，若將乳鐵蛋白水解物和溶菌酶並用，表現出來的抗菌效果會變得較佳。Facon *et al.* (1995) 將乳鐵蛋白水解物及溶菌酶兩者其中一個的添加濃度固定，另一個則是以不同的濃度添加到 tryptic soy broth (TSB) 中，發現將溶菌酶的濃度固定，單獨增加乳鐵蛋白水解物的濃度時，會增加抗菌效果；但若將乳

鐵蛋白水解物的濃度固定，單獨增加溶菌酶的濃度時，則不會增加抗菌效果。這表示抗菌混合物是藉由減低 *S. enteritidis* 的生長速率及對菌體造成傷害而達到抗菌的效果，且溶菌酶要表現其抗菌效果需依靠乳鐵蛋白水解物先對菌體的 LPS 產生作用。

Tomita *et al.* (1997) 的新抗菌劑研發專利報告指出牛乳鐵蛋白之酸水解物及胃蛋白酶水解物會與多種抗菌物質產生協同作用，包括 EDTA·2Na、抗壞血酸 (ascorbic acid) 及其鹽類、檸檬酸 (citric acid) 及其鹽類、聚磷酸 (polyphosphoric acid) 及其鹽類、膽酸 (cholic acid)、聚乙二醇 #2000 (polyethylene glycol #2000)，以及 penicillin、ampicillin、cephalothin、erythromycin、kanamycin、staphcillin、streptomycin、hostacyclin、gentamicin、polymyxin B、chloramphenicol 等抗生素。Tomita *et al.* (1997) 並從胃蛋白酶水解物中分離出兩個微生物胜肽片段，這兩個胜肽片段也會與多種抗菌物質產生協同作用，包括牛乳鐵蛋白、caseinphosphopeptide、生育醇 (tocopherol)、 $\beta$ -cyclodextrin、乙醇 (ethyl alcohol) (99.5%)、幾丁聚糖 (chitosan)、L-半胱氨酸 (L-cysteine)、丙二醇 (propylene glycol)、甘油 (glycerol) 及多種脂肪酸甘油酯 (glycerin-fatty acid ester)，如 1-monocapryloyl-rac-glycerol、1-monomyristoyl-rac-glycerol、1-monolauryl-rac-glycerol、1-monostearoyl-rac-glycerol。

### 三、乳鐵蛋白素 (lactoferricin; LFcin) 之簡介

Tomita *et al.* (1991) 以胃蛋白酶分別對牛乳鐵蛋白及人乳鐵蛋白進行切割，並從兩水解產物中分離出更具抗微生物活性的胜肽。接著，Bellamy *et al.* (1992) 將造成乳鐵蛋白水解物具有抗微生物活性的胜肽分離出來，經純化後進行定序，分別命名為牛乳鐵蛋白素與人乳鐵蛋白素。經比對原蛋白的序列後發現，兩者皆來自於乳鐵蛋白的 N1 區域。牛乳鐵蛋白素含有 25 個胺基酸殘基，人乳鐵蛋白素則含有 47 個胺基酸殘基，並且帶有一段與牛乳鐵蛋白素相似的序列。之後也有研究發現，在乳鐵蛋白之胃蛋白酶水解物當中，亦可分離出其他來自於乳鐵蛋白 N1 區域的抗菌胜肽 (Dionysius *et al.*, 1997; Hoek *et al.*, 1997)。

乳鐵蛋白素的抗菌範圍相當的廣 (Bellamy *et al.*, 1992b; Jones *et al.*, 1994; Shin *et al.*, 1998)，能夠抑制革蘭氏陽性菌與革蘭氏陰性菌 (包括數種病原菌)、酵母菌、黴菌，甚至是寄生蟲 (Tanaka *et al.*, 1995)。此外，乳鐵蛋白素在相當低的濃度 (0.5-500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 下，即可對革蘭氏陽性菌與革蘭氏陰性菌產生抑制效果 (Bellamy *et al.*, 1992b; Jones *et al.*, 1994)。又乳鐵蛋白素在廣泛的 pH 值範圍內，皆具有抗菌活性。

## (一) 乳鐵蛋白素之生產與應用

在酸性條件下，以豬的胃蛋白酶對乳鐵蛋白進行水解 (Saito *et al.*, 1991)。待乳鐵蛋白被完全水解之後，先透過加熱處理使酵素失活，再將水解液以逆滲透的方式進行過濾與濃縮。將滅過菌的水解液進行冷凍乾燥，所得之水解物可以利用兩段式疏水性層析法 (two-step hydrophobic chromatography) 來進行純化，分離出乳鐵蛋白素 (Bellamy *et al.*, 1992)。以酸性緩衝液沖提管柱後，再將沖提液以逆滲透的方式進行濃縮，最後經由冷凍乾燥所得乳鐵蛋白素粉末的純度可達 95% 以上。目前，這項生產程序已經取得專利。

有報告指出，當小鼠口服乳鐵蛋白素後，可使其免於感染 MRSA 或是寄生蟲—*Toxoplasma gondii* (Nakasone *et al.*, 1994; Isamida *et al.*, 1998)。

## (二) 乳鐵蛋白素的結構與特性

牛乳鐵蛋白與人乳鐵蛋白經過胃蛋白酶處理後，分別會釋出牛乳鐵蛋白素 (見圖一 B；綠色部分為第 12-45 個胺基酸序列位置，而黃色部分為第 1-11 個胺基酸序列位置) 與人乳鐵蛋白素 (見圖一 A)，而人乳鐵蛋白素第 11 與第 12 個胺基酸殘基的連接處也會被水解掉，但這兩段胜肽之間會因形成雙硫鍵而彼此連接。

當牛乳鐵蛋白素從完整的牛乳鐵蛋白釋出後，其結構會徹底的改變 (Hwang *et al.*, 1998; Schibli *et al.*, 2000)。當牛乳鐵蛋白素溶解在水溶液中，會由原先在牛乳鐵蛋白中的  $\alpha$ -螺旋結構，變成扭曲的  $\beta$ -摺板結構 (圖六)，且幾乎所有的疏水性基團都會排列在牛乳鐵蛋白素的同側，而牛乳鐵蛋白素的另一側則大多是鹼性胺基酸殘基。這種兩性胜肽結構與其他的抗微生物胜肽相似，像是蛙皮素 (magainin) 等，能讓牛乳鐵蛋白素容易與帶負電的細胞膜表面作用 (Bechinger *et al.*, 1993; Gesell *et al.*, 1997; Hwang *et al.*, 1998; Schibli *et al.*, 2000)。

有 2 個色胺酸殘基會位在牛乳鐵蛋白素的同一側，這 2 個色胺酸殘基對牛乳鐵蛋白素的抗菌活性十分重要，若是用丙胺酸作取代，則會明顯減少其抗菌效果 (Kang *et al.*, 1996; Strøm *et al.*, 2000) (表四)。事實上，早有研究指出六元胜肽，即 RRWQWR-NH<sub>2</sub>，為牛乳鐵蛋白素的抗菌活性部位 (Tomita *et al.*, 1994)。在水溶液中，該線性胜肽非常具有彈性，且構形多變。當六元胜肽遇到由 SDS 構成之微胞時，六元胜肽會先以 3 個帶正電的精胺酸附著在帶有負電的微胞表面，再利用色胺酸將胜肽插入微胞中，形成一穩定的構形 (Schibli *et al.*, 1999b)。當延伸六元胜肽的兩端，使形成帶有 11 個胺基酸殘基的胜肽，該胜肽仍會以此方式與 SDS 微胞表面結合 (Schibli *et al.*, 研究結果未發表)。由此可知，牛乳鐵蛋白素是個非常具有彈性的胜肽，

它會因環境的不同而改變其結構，該項動態特徵很可能是使牛乳鐵蛋白素具有許多生理活性的原因。

### (三) 抗菌機制

#### 1. 胞外

目前已經提出許多種不同的抗生素穿過細胞膜的機制 (Nikaido *et al.*, 1979; Hancock *et al.*, 1981)。其中，透過抗菌胜肽與磷脂質膜模型的相互作用機制已經證實了，抗菌胜肽對淨電荷為 0 的磷脂質 (zwitterionic phospholipids) 的親和力很低 (Gazit *et al.*, 1994)。而 Vorland *et al.* (1999) 提出了「二階段作用機制」：首先，胜肽鏈上帶正電的胺基酸殘基會與革蘭氏陰性菌外膜上的脂多醣體 (LPS) 帶負電的位置發生反應；結果會造成外膜結構的瓦解。其次，利用疏水性作用力，使 W (Trp) 能更進接近脂質 A (lipid A)，如此，抗菌胜肽就能更進一步的穿透外膜。

此作用機制說明了，野生的與培養的變異種對疏水性抗生素的敏感度，會因外膜組織的不同，以及抗菌胜肽接近磷脂質雙層膜的難易度不同而有所不同 (Nikaido *et al.*, 1979)。此外，抗菌分子是否為疏水性、帶正電，以及其二級結構為何，都與抗菌效果有關 (Shai, 1999)。以牛乳鐵蛋白素來說，目前已經鑑定出在其胺基酸序列中包含有一特

定區段，此區段包含 11 個胺基酸殘基，並為牛乳鐵蛋白素主要產生抗菌效果的因素 (Kang *et al.*, 1996)。而人乳鐵蛋白素則是在胺基酸殘基—1-5 (GRRRR) 及 19-31 (KCFWQRNMRKVR) —對抗菌活性很重要 (Moriarty, 2002)。人乳鐵蛋白素的胺基酸殘基—20-37 及完整的牛乳鐵蛋白素會與 LPS 產生交互作用，而人乳鐵蛋白素及牛乳鐵蛋白素的 28-34 loop regio 會與 LPS 結合 (Elass-Rochard *et al.*, 1995)。

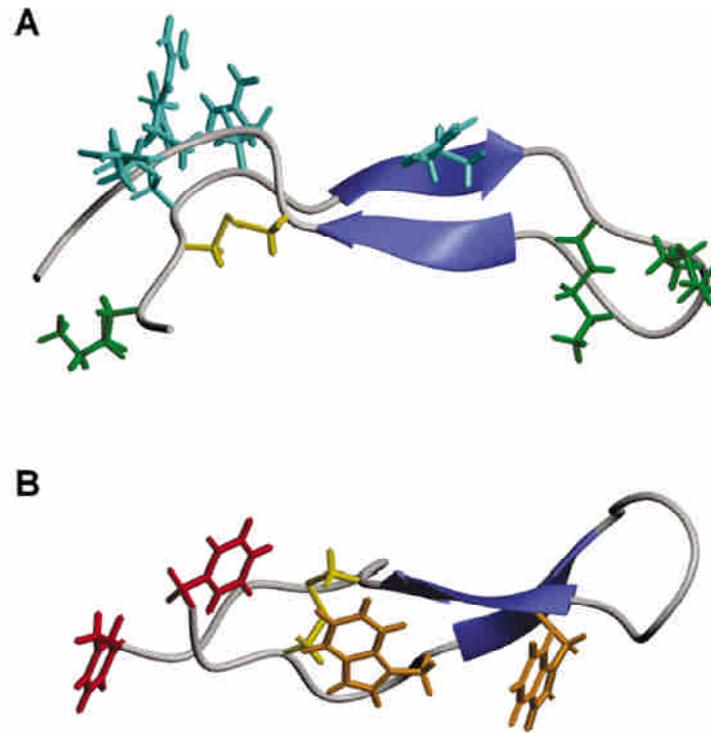
Ulvatne *et al.* (2001) 指出牛乳鐵蛋白素會與菌體外膜帶負電的位置結合，使菌體外膜失去極性，然而，菌膜的組成依然完整，所以不會造成胞內物質嚴重的洩漏，因此細菌外膜結構的破壞，不大可能會是造成菌體死亡的主因。革蘭氏陰性菌會對帶正電的胜肽很敏感，與下列幾個幫助胜肽穿透外膜的因子有關 (Shai, 1999)，包括 LPS 的帶電量及帶電位置、外膜中的 LPS 濃度、外膜分子的結構、有無 O-抗原。

根據「二階段作用機制」得知，帶正電的胜肽並非是一個抗菌劑，它比較可能會是一個能提升更多有效抗生素殺菌力的瓦解劑，或是浸透性的試劑。

## 2. 胞內

大部分的抗菌胜肽都具有一個帶正電的兩性 (amphipathic) 構

形，並會對菌體的原生質膜 (cytoplasmic membrane) 產生影響，此為其主要的抗菌作用機制。其他如結合 DNA、RNA 和蛋白質，以及抑制 DNA 及 (或) 蛋白質的合成等機制亦被提出，而牛乳鐵蛋白素其產生的抑菌及殺菌效果較慢且不會瓦解菌體的原生質膜，這表示其可能的作用對象是在胞內。Haukland *et al.* (2001) 研究發現當牛乳鐵蛋白素的使用劑量低於最小抑菌濃度時，菌體細胞質內可以偵測到牛乳鐵蛋白素的存在。Ulvatne *et al.* (2004) 將合成 DNA、RNA 及蛋白質的前驅物改用具有放射活性的前驅物 (radioactive precursors) 以證實牛乳鐵蛋白素在菌體中對於巨分子合成 (macromolecular synthesis) 的影響。對 *Escherichia coli* UC 6782 這株菌而言，在胞內巨分子合成的初期，牛乳鐵蛋白素會使蛋白質和 RNA 的合成量增加，而使 DNA 的合成量減少。10 分鐘過後，蛋白質和 RNA 的合成量會顯著的下降，此時，DNA 的合成量則會增加。對 *Bacillus subtilis* 這株菌而言，胞內所有的巨分子合成反應都會受到牛乳鐵蛋白素的抑制至少達 20 分鐘。20 分鐘過後，RNA 的合成量增加。由此研究結果可知，當牛乳鐵蛋白素之濃度即使未達殺菌效果，但仍可抑制具有放射活性的前驅物與革蘭式陽性及陰性菌體內的巨分子結合。



圖六、牛乳鐵蛋白素在溶液中的結構。除了骨架與雙硫鍵的部分，(A) 精胺酸與離胺酸以及 (B) 芳香族胺基酸的支鏈也有顯示出來。

Fig. 6. Solution structures of lactoferricin B. In addition to the backbone and the disulfide bond, the sidechains of the (A) Arg and Lys groups and (B) aromatic groups are shown.

(Vogel *et al.*, 2002)

表四、牛乳鐵蛋白素及其相似胜肽片段對*Escherichia coli*的抗菌表現。

Table 4. Antimicrobial activity of some peptide analogs of lactoferricin B against *Escherichia coli*.

| Amino acid sequence (substitutions in bold) | MIC          |
|---|--------------|
| Lfcin B <sup>a</sup>                        | 22.5 µg/mL   |
| RRWQWRMKKLG <sup>a</sup>                    | 22.5 µg/mL   |
| <b>KK</b> WQWKMKKG <sup>a</sup>             | 30.0 µg/mL   |
| RRWQWR <b>RR</b> LG <sup>a</sup>            | 11.3 µg/mL   |
| RRAA <b>AR</b> AKKAG <sup>a</sup>           | >120.0 µg/mL |
| FKCRRWQWRMKKLG <sup>b</sup>                 | 24.0 µM      |
| FKC <b>RR</b> AQWRMKKLG <sup>b</sup>        | > 100.0 µM   |
| FKCRRWQ <b>AR</b> MKKLGA <sup>b</sup>       | > 100.0 µM   |

<sup>a</sup>Data taken from Kang *et al.* (1996).

<sup>b</sup>Data taken from Strøm *et al.* (2000).

### (三) 抗菌效果

Bellamy *et al.* (1992) 發現由牛乳鐵蛋白之胃蛋白酶水解物中，分離所得之牛乳鐵蛋白素對於革蘭氏陽性菌及陰性菌皆具有廣泛的抗菌效果，包括 *Escherichia coli*、*Salmonella enteritidis*、*Klebsiella pneumoniae*、*Proteus vulgaris*、*Yersinia enterocolitica*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Campylobacter jejuni*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus mutans*、*Corynebacterium diphtheriae*、*Listeria monocytogenes* 以及 *Clostridium perfringens*。牛乳鐵蛋白素的最小抑菌濃度範圍在 0.3-150  $\mu\text{g/mL}$ ，該結果會受到菌種與所使用之培養基的影響。牛乳鐵蛋白素在 pH 5.5-7.5 的條件下，皆能對 *E. coli* O111 表現出抗菌效果，其中在弱鹼性的條件下會有最強的抗菌表現。Bellamy *et al.* (1992) 並指出當環境中存在  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  或  $\text{Ca}^{2+}$  等金屬離子，或是環境中存在具有緩衝能力的鹽類時，牛乳鐵蛋白素的抗菌效果會下降，但是環境中存在  $\text{Fe}^{3+}$  時，牛乳鐵蛋白素的抗菌效果則不受影響 (Bellamy *et al.*, 1993)。牛乳鐵蛋白素也能表現出殺菌效果，然而 *Pseudomonas fluorescens*、*Enterococcus faecalis* 及 *Bifidobacterium bifidum* 對牛乳鐵蛋白素具有高度的抗性 (Bellamy *et al.*, 1992)。

Bellamy *et al.* (1992) 將乳鐵蛋白素末端的雙硫鍵打斷、破壞其環

狀結構後，其抗菌活性並無改變，這表示乳鐵蛋白素的環狀或線性結構都不會影響其抗菌效果。Hoek *et al.* (1997) 發現來自乳鐵蛋白素的兩個片段，即 FKCRRWQWRm' 與 KKLGA PSITCVRRAFA 都保有抗菌活性。前者的 N 端帶有 FKCRR 序列，此段序列為乳鐵蛋白素的代表性序列，且在生理的 pH 下會帶有 5 個正電荷；後者的 N 端帶有 KKLGA 序列，此段序列存在於乳鐵蛋白素的 C 端，且在生理的 pH 下會帶有 4 個正電荷。因此，乳鐵蛋白素的抗菌活性無法被定位在單一區域中，其抗菌活性主要是由前 10 個 N 端殘基提供的，另外有部分是由其他剩下的殘基所提供的。

目前鹼性抗菌肽的作用機制都專注在它們與敏感細菌 (susceptible bacteria) 細胞膜上帶負電元素之間的交互作用 (Nikaido *et al.*, 1985)，這些元素分別為革蘭氏陰性菌的脂多醣體及革蘭氏陽性菌的磷壁酸 (lipotechoic acid)。乳鐵蛋白素及其片段所具有的非專一性抗菌活性可能是因為，它們能與敏感菌的一般表面結構 (例如：革蘭氏陰性菌的脂多醣體及革蘭氏陽性菌的磷壁酸) 產生相似的交互作用，而且該抗菌活性與膜滲透阻礙的調整 (compromise of the membrane permeability barrier) 有關 (Hoek *et al.*, 1997)。

#### (四) 協同抗菌作用 (synergistic effect)

Yamauchi *et al.* (1993) 則證實了當人體的溶菌酶及人的乳鐵蛋白素在 1% peptone 中有協同作用。Vorland *et al.* (1999) 將牛乳鐵蛋白素與不同的抗生素 (如 penicillin G、vancomycin、gentamicin、colistin、D-cycloserine 及 erythromycin) 作搭配使用，發現牛乳鐵蛋白素與紅黴素 (erythromycin) 會對 *Escherichia coli* 表現出協同的抗菌效果 (synergistic effect)，而牛乳鐵蛋白素與 penicillin G、vancomycin 及 gentamicin 則會對 *E. coli* 表現出部分的協同抗菌效果。只有 penicillin G 與牛乳鐵蛋白素並用會對 *Staphylococcus aureus* 表現出部分的協同抗菌效果。當牛乳鐵蛋白素在低濃度下與 vancomycin 或 gentamicin 並用時，才會對 *S. aureus* 表現出節抗作用。Ulvatne *et al.* (2001) 發現在較短的或是含有部分取代基的乳鐵蛋白素衍生物與紅黴素 (erythromycin) 之間，也存在著相同的協同抗菌機制。

#### 四、Lactoferrampin (LFampin) 之簡介

目前已知牛乳鐵蛋白的抗菌活性來自位於其 N1 區域中的乳鐵蛋白素，但 van der Kraan *et al.* (2004) 根據所有抗微生物胜肽共同擁有的特性 (即  $\alpha$ -螺旋)，推測在牛乳鐵蛋白的 N1 區域中可能還有另外一個具有抗菌活性的胜肽，即 lactoferrampin (LFampin)，而研究結果發

現 LFampin 比完整的牛乳鐵蛋白更具有殺菌性，且 LFampin 能有效的殺死 *Bacillus subtilis*、*Escherichia coli* 及 *Pseudomonas aeruginosa*，但不能殺死 *Actinomyces naeslundii*、*Porphyromonas gingivalis*、*Streptococcus mutans* 及 *Streptococcus sanguis* 等發酵菌株。

### (一) LFampin 的生產

將牛乳鐵蛋白溶解於 50 mM 的磷酸鈉緩衝液 (sodium phosphate buffer) (pH 8.0) 中，先以含有 50 mM DTT 的 6 M Guanidine HCl 進行還原處理，再以 iodoacetamide 終止還原反應，所得消化液 (digest) 以 endoprotease AspN (E/S = 0.05%) 進行 20 個小時的水解反應，或以 endoprotease ArgC (E/S = 0.5%) 進行 30 分鐘的水解反應，或合併使用這兩種酵素來進行水解反應。待乳鐵蛋白被完全水解之後，先透過 75°C、5 分鐘的加熱處理使酵素失活，再將水解液以反相高效液相層析管柱進行純化，即可分離出與 van der Kraan *et al.* (2004) 所發現的 LFampin 268-284 相似之胜肽片段 (見圖七及表五) (Bolscher *et al.*, 2006)。

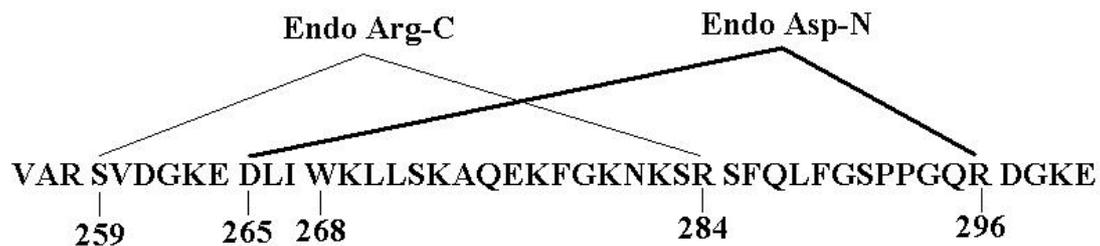
### (二) LFampin 的特徵

LFampin 268-284 (WKLLSKAQEKFGKNKSR) 為一具有兩性特徵之  $\alpha$ -螺旋胜肽 (見圖八)，在 pH 7.0 時，淨電荷為 +5，且其疏水性

力矩的理論值為 5.42 ( $\alpha = 100^\circ$ ) (van der Kraan *et al.*, 2004)。LFampin 與人乳鐵蛋白的 N1 區域有 70% 的同源性、相似性，然而，可能由於兩者所帶之淨電荷值不同 (分別為+5 與+2)，因此前者的抗菌活性高於後者 (Nibbering *et al.*, 2001; van der Kraan *et al.*, 2004)。

### (三) 抗菌機制

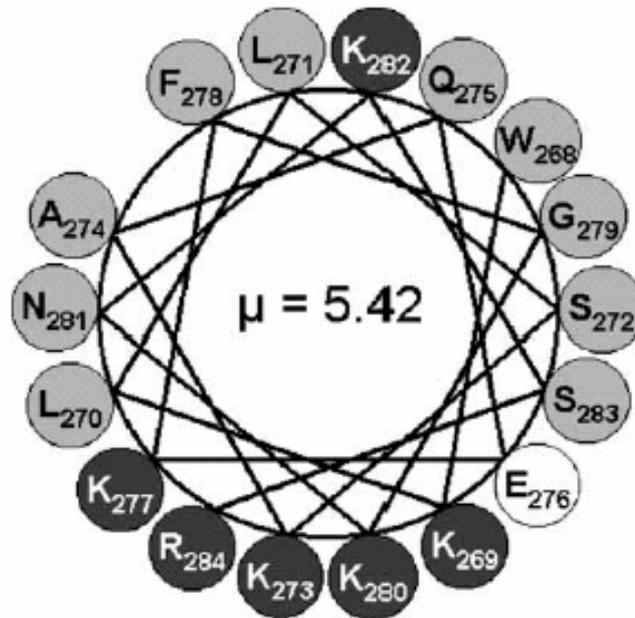
目前對兩親性陽離子肽的抗菌活性來源有下列幾個假設，是來自於它們對目標細胞生物膜的作用，或藉由形成孔洞、或是使細胞膜變薄亦或是由非形成孔洞性的不穩定效應 (Gazit *et al.*, 1995; Heller *et al.*, 2000)。Van der Kraan *et al.* (2005b) 發現來自於牛乳鐵蛋白的兩個抗菌區域之肽，即 LFcIn 17-30 (牛乳鐵蛋白素之衍生肽) 與 LFampin 會通過細胞膜，且會對 *C. albicans* 及 *E. coli* 的原生質膜組成產生很大的影響。LFcIn 17-30 會使 *C. albicans* 在細胞膜上形成泡疹與膜內顆粒聚集體。LFampin 265-284 只比 LFampin 268-284 多了三個胺基酸 (Asp-Leu-Ile)，但是卻會造成脂質雙層膜的部分崩解，細菌的細胞膜會被瓦解成不同直徑大小的囊泡狀構造，因此，推測 LFampin 265-284 具有類似清潔劑的活性 (detergent-like activity)，藉由降低細胞膜的表面張力 (surface tension)，使得脂質雙層膜崩解成小的囊泡，且囊泡會以細胞壁內包的形式結合在一起。此外，透過穿



圖七、 水解牛乳鐵蛋白所得之LFampin胜肽。

Fig. 7. LFampin peptides resulting from in silico digestion of bovine lactoferrin (bLF). Peptides containing the sequence 268-284 can be released from bLF by endoproteinase ArgC, releasing fragment LFampin 259-284, and by endoproteinase AspN, releasing fragment LFampin 265-296, whereas both enzymes result in LFampin 265-284.

(Bolscher *et al.*, 2006)



圖八、 LFampin兩性特徵之螺旋輪示意圖。

Fig. 8. Helical wheel presentation of LFampin, which indicates the amphipathic character of the peptide: neutral amino acids are colored in light gray, the positively charged amino acids colored in dark gray and negatively charged amino acids presented in white.

(van der Kraan *et al.*, 2004)

表五、 合成與水解牛乳鐵蛋白所得之LFampin的性質。

Table 5. Properties of synthetic LFampin and LFampin peptides releasable by proteolytic digestion of bovine lactoferrin.

| Peptide #AA <sup>a</sup> | Enzyme    | Sequence                         | $M_r$ | Charge <sup>b</sup> | LC <sub>50</sub> (μM) <sup>c</sup> |                |
|--------------------------|-----------|----------------------------------|-------|---------------------|------------------------------------|----------------|
|                          |           |                                  |       |                     | <i>C. albicans</i>                 | <i>E. coli</i> |
| LFampin 268-284          |           | WKLLSKAQEKFGKNKSR                | 2048  | 5+                  | 2.1±0.4                            | 5.8±0.7        |
| LFampin 259-284          | ArgC      | SVDGKEDLIWKLLSKAQEKFGKNKSR       | 3006  | 3+                  | 2.3±0.2                            | 11.7±0.5       |
| LFampin 265-296          | AspN      | DLIWKLLSKAQEKFGKNKSRSFQLFGSPPGQR | 3692  | 5+                  | 0.5±0.2                            | 2.5±0.2        |
| LFampin 265-284          | AspN/ArgC | DLIWKLLSKAQEKFGKNKSR             | 2390  | 4+                  | 0.7±0.3                            | 5.5±0.9        |

<sup>a</sup>Amino acids are numbered in accordance to Rey *et al.* (1990).

<sup>b</sup>Net positive charge at neutral pH.

<sup>c</sup>LC50: the concentration of peptide (mM) resulting in 50 % reduction of the viable counts as measured by the viability assay.

(Bolscher *et al.*, 2006)

透式電子顯微鏡會發現 LFampin 265-284 會分布在脂質雙層膜的疏水性界面。LFampin 265-284 因為多了 Asp-Leu-Ile 這三個胺基酸，因此使得 LFampin 在前端形成  $\alpha$ -螺旋結構 (helix-capping motif) (Aurora *et al.*, 1998)，且透過圓二色光譜分析的結果發現，LFampin 265-284 形成  $\alpha$ -螺旋的傾向會高於 LFamin 268-284 (van der Kraan *et al.*, 2005a)。

Van der Kraan *et al.* (2005b) 比對 LFcin 17-30 與 LFampin 對 *E. coli* 細胞膜的影響與其殺菌活性，得知胜肽會以漸進的方式將細胞膜激烈的分化，其中又以 LFcin 17-30 對細胞膜產生的影響最強。研究結果顯示 LFcin B 會流動於 *E. coli* 的內外膜間，類似的情形也會發生在帶有負電的微脂粒 (liposomes) 上 (Ulvatne *et al.*, 2004)，而進入細胞內的 LFcin B 會使 *E. coli* 的細胞膜失去極性，這一點，Haukland *et al.* (2001) 與 Ulvatne *et al.* (2001) 也有提到。而且，LFcin B 及 LFcin H 20-30 會使 *E. coli* 的細胞膜形成水泡，進而在細胞膜表面產生突起 (Chapple *et al.*, 1998; Shin *et al.*, 1998; Yamauchi *et al.*, 1993)，LFcin H 20-30 也會造成外膜剝離，形成一個較大的細胞膜間隙 (Chapple *et al.*, 1998)。

#### (四) 抗菌效果

LFampin 的抗菌活性至少為牛乳鐵蛋白的 3.5 倍 (見表六)，如果從克分子質量的基準上來做比較 (牛乳鐵蛋白的質量是 LFampin 的 100 倍以上)，則二者的抗菌活性則相差甚遠，但是 LFampin 的劑量-回應曲線 (dose-response curves) 的形狀雖相似於牛乳鐵蛋白，不過比較陡，這表示二者與菌體結合及殺菌的機制有所不同。LFampin 及 bLF 17-30 雖然都具有兩性，且都帶有正電荷，但是兩者表現出來的抗菌活性卻不同，相較於 bLF 17-30，LFampin 所需要的殺菌濃度及時間均高於 bLF 17-30。這表示當胺基酸的相對位置及胜肽鏈的長短有不同時，胜肽鏈形成的 3D 結構就會不同，抗菌的機制就會不同。

乳鐵蛋白主要分佈於哺乳動物之體液中，包括母乳、唾液、眼淚及黏膜分泌液，亦可由發炎反應中活化之嗜中性白血球所釋放，也是哺乳動物的免疫因子之一，所以這個在牛乳鐵蛋白中新發現的區域所表現出來的活性可能遍佈全身。牛乳鐵蛋白經由胃蛋白酶消化切割後，會釋放出牛乳鐵蛋白素，但是含有一些胃蛋白酶切割點的 LFampin 容易被胃蛋白酶消化切割，然而，切割後所得之 LFampin 片段—WKLLSKAQEK (bLF 268-278) 及 GKNKSR (bLF 279-284) 具有抗 *C. albicans* 的效果。當胜肽的濃度  $\geq 200 \mu\text{M}$  時，無論是等莫耳比例混合這二個片段，或是獨立片段，都無法表現抗真菌的

活性 (van der Kraan *et al.*, 研究結果未發表)。

表六、 LFampin、bLF 17-30及牛乳鐵蛋白的抗菌表現。

Table 6. LC<sub>50</sub>-values<sup>a</sup> of LFampin, bLF 17-30 and bLF towards various microorganisms.

|                          | LFampin            |                    | bLF 17-30          |                    | bLF                |                     |
|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
|                          | μM                 | μg/mL              | μM                 | μg/mL              | μM                 | μg/mL               |
| <i>C. albicans</i>       | 2.1                | 4.3                | 1.5                | 2.9                | 7.4                | 578                 |
| <i>B. subtilis</i>       | 18                 | 36.9               | 10                 | 19.2               | 43                 | 3356                |
| <i>E. coli K12</i>       | 5.8                | 11.9               | 1.8                | 3.5                | 3.5                | 273                 |
| <i>E. coli O157:H7</i>   | 25                 | 51.2               | 1.9                | 3.7                | 15                 | 1171                |
| <i>P. aeruginosa Pak</i> | 7                  | 14.3               | 1.5                | 2.9                | 5.3                | 414                 |
| <i>A. naeslundii</i>     | > 100 <sup>b</sup> | > 200 <sup>b</sup> | 10                 | 19.2               | 73                 | 5698                |
| <i>P. gingivalis</i>     | > 100 <sup>b</sup> | > 200 <sup>b</sup> | > 100 <sup>b</sup> | > 200 <sup>b</sup> | > 100 <sup>b</sup> | > 7800 <sup>b</sup> |
| <i>S. sanguis</i>        | > 100 <sup>b</sup> | > 200 <sup>b</sup> | 5.5                | 10.6               | > 100 <sup>b</sup> | > 7800 <sup>b</sup> |
| <i>S. mutans</i>         | > 100 <sup>b</sup> | > 200 <sup>b</sup> | 5.5                | 10.6               | > 100 <sup>b</sup> | > 7800 <sup>b</sup> |

<sup>a</sup>LC<sub>50</sub>: The concentration of peptide (μM and μg/mL) resulting in 50% reduction of the viable counts of the microorganism as measured by the viability assay.

<sup>b</sup>Highest concentration tested.

(van der Kraan *et al.*, 2004)

Lfampin 可以抗 *E. coli*、*P. aeruginosa* 及 *B. subtilis*，但是卻不能抗 *P. gingivalis*、*A. naeslundii*、*S. mutans* 及 *S. sanguis*。細菌為了要抵抗 LFampin，不以呼吸作用供能，而會改採用發酵的方式來提供菌體能量。此外，不同種的 *E. coli* 對相同的胜肽 (LFampin)，會表現出不同的敏感度 (LC<sub>50</sub>-values)。

#### (五) 安全性

Van der Kraan *et al.* (2004) 在 PBS (高離子強度的緩衝液) 及 IGP (其離子強度等同於 1 mM 的 PBS) 中，測量 LFampin 及 bLF 17-30 的溶血活性。結果顯示，在 PBS 緩衝液中，當胜肽濃度為 100 μM 時，皆會誘導人類的紅血球釋出血紅素。在 IGP 緩衝液中，LFampin 表現溶血活性的濃度比表現抗菌活性的濃度要高上許多。

### 五、乙二胺四醋酸 (ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) 之簡介

乙二胺四醋酸 (ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) 為結構對稱穩定的含氮有機物，分子式為 (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)，在 240°C 時會分解，難溶於水但其鹽類則易溶於水，是一種常用的螯合劑

(chelating agent)，可解離出四個  $H^+$ ，螯合能力很強，又以螯合  $Fe^{3+}$  的能力最強，螯合的穩定常數受 pH 值影響很大。

EDTA 通常以鈉鹽的型態存在，可形成  $EDTA \cdot 1Na$ 、 $EDTA \cdot 2Na$ 、 $EDTA \cdot 3Na$ 、 $EDTA \cdot 4Na$  等四種鹽類，各種鈉鹽的物化特性有些不同，而 EDTA 通常是以鈉鹽或鉀鹽的型態來和金屬螯合。

$EDTA^{4-}$  有六個接觸位置 (hexadentate ligand)，包括二個胺基 (amino groups) 和四個羧基 (carboxylic groups)，可從圖九中看出，因為四個醋酸根離子及二個氮原子，都有形成共價鍵所需之自由電子對，而中心離子則當做電子接受者，和金屬螯合形成八面體結構，EDTA 和  $Ca^{2+}$  螯合形成之立體結構圖如圖十所示；可發現其連結點有六處，包括二個氮原子及四個羧酸根中的氧原子。

### (一) EDTA 於食品添加劑上的應用

EDTA 的添加可以抑制食品於加工過程中產生褐變，所以在香蕉的加工過程會添加褐變抑制劑 (200 ppm EDTA, 200 ppm cysteine, 300 ppm Vit. C)，且在罐頭冷凍蔬菜、馬鈴薯沙拉、蛋黃醬、沙拉醬及一些罐頭食品的加工過程中，皆有添加 EDTA 以防止褐變發生。

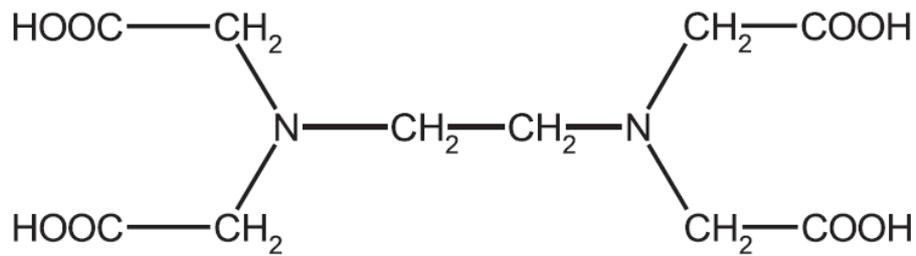
最常用在食品上的形式為  $Na_2EDTA$  及  $CaNa_2EDTA$ ，其添加量

約在 20-800 ppm 間 (J. Heimbach *et al.*, 2000)，其用途除了增加金屬在生物體內的吸收，也有防腐的作用，及避免金屬被氧化，使食品的顏色穩定。依據國內衛生署食品衛生處公佈之“食品添加物使用範圍及用量標準”(民 77)， $\text{Na}_2\text{EDTA}$  及  $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$  可使用在防止油脂氧化而引起變味之食品，而用量則限制在 0.1 g/Kg 以下 (以食品重量計)。而在國外，EDTA 也是被廣泛應用在食品當中作為一螯合劑 (chelating agent) 使用 (21 CFR 172.135)，可避免受金屬離子催化而產生的氧化反應與其他變質反應 (deteriorative reactions)。

EDTA 亦有抗微生物的活性，而且能夠當作抗菌劑及抗生素來使用，尤其是能夠抗革蘭氏陰性菌。Hathcox *et al.* (1996) 發現在胰酪蛋白大豆培養基中添加 EDTA 對大腸桿菌有明顯的抑制現象。在大多數的文獻當中，EDTA 會與一至兩種抗菌物質結合，進行抗菌試驗，由於 EDTA 可使革蘭氏陰性菌的細胞膜改變、增加其通透性，因此有許多文獻指出 EDTA 會增強抗菌物質的活性，包括乳酸鏈球菌素 (nisin)、溶菌酶 (lysozyme)、actinomycin、rifampicin 及單元月桂酸甘油酯 (monolaurin) (Hughey *et al.*, 1987; Stevens *et al.*, 1991; Stevens *et al.*, 1992; Razavi-Rohani *et al.*, 1994)。

另外，在某些必需元素補充劑中，也會添加螯合劑 (如

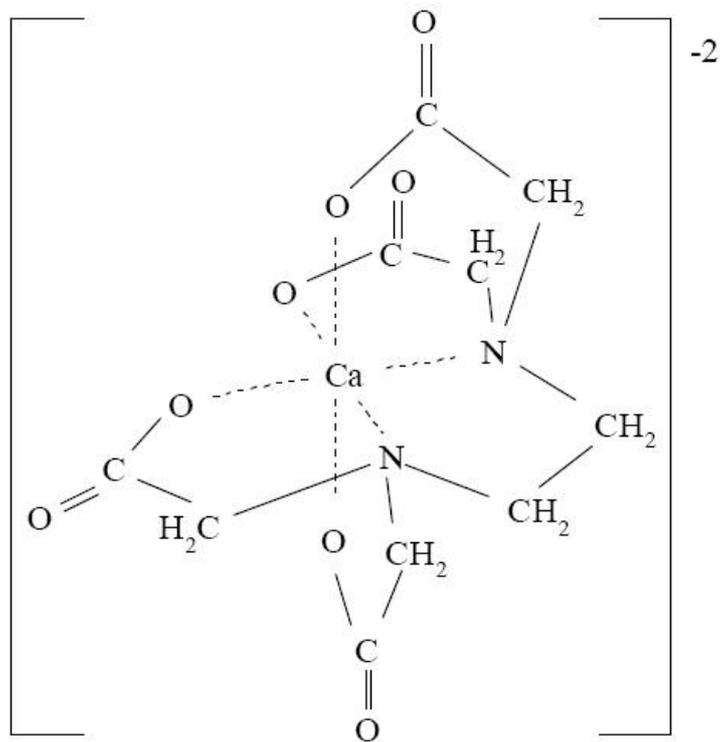
EDTA)，像  $\text{Fe}^{3+}$  在  $\text{pH} > 3$  的時候，會以  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  的形式沉澱下來，所以很難被人體吸收，因此在鐵補充劑中就會含有 EDTA 等螯合劑的存在 (J. Heimbach *et al.*, 2000)。



圖九、 EDTA 的分子結構。

Fig. 9. Molecular structure of EDTA.

(Oviedo *et al.*, 2003)



圖十、  $[\text{Ca}(\text{EDTA})]^{2-}$  的結構。

Fig. 10. Structure of  $[\text{Ca}(\text{EDTA})]^{2-}$ .

(李，2001)

## (二) EDTA 的毒性

EDTA 非致癌物質，對基因也沒有直接的傷害性，美國藥物食品檢驗局 (FDA) Fe-EDTA 來估計 EDTA 的攝取劑量毒性，得人體平均最大攝取量為 1.15 mg/kg bw/day，低於其平均容許攝取量 2.5 mg/kg bw/day (J. Heimbach *et al.*, 2000)。

## 五、研究目的

乳鐵蛋白水解物具有許多優點，包括：

(1) 對於革蘭氏陰性菌及革蘭氏陽性菌具有廣泛的抗菌效果，且水解物的抗菌活性為完整乳鐵蛋白分子的 9-20 倍。

(2) 水解物的抗菌表現不會受到環境中存在的鐵影響。

(3) 水解物具有熱穩定性，能耐 121°C、15 分鐘的加熱處理。

(4) 水解物在 pH 3-7 的條件下皆具有抗菌活性，並能在該條件下以水溶液狀態冷藏三個月以上，而不會降低其抗菌效果。

(5) 能夠被冷凍乾燥成粉末，便於保存、運送與添加到食品系統中。

(6) 水解物能與多種抗菌物質產生協同作用。

Murdock and Matthews (2002) 將牛乳鐵蛋白之胃蛋白酶水解物添加到不同 pH 值 (pH 4.0 與 7.0) 的超高溫瞬間殺菌處理過之牛乳 (ultra-high temperature milk; UHT milk) 中，並將牛乳培養於不同的溫度 (4°C 與 35°C) 下，探討水解物對 *Salmonella Stanley*、*Escherichia coli* O157:H7、*Listeria monocytogenes* 與 *Staphylococcus aureus* 等食物病原菌的抗菌效果。研究結果發現，水解物在 pH 4.0 的 UHT 牛乳中可使 *E. coli* O157:H7 與 *L. monocytogenes* 的生長情形下降約 2 個對數值。目前還沒有人將牛乳鐵蛋白水解物添加到生鮮肉及肉製品中，探討水解物的抗菌表現，因此，我們希望利用抗菌效果更佳，且更具食品加工特性的牛乳鐵蛋白水解物，作為天然的食品保存劑。然而，Bellamy *et al.* (1992a) 指出，當環境中的  $\text{Ca}^{2+}$  及  $\text{Mg}^{2+}$  的濃度為 1-5 mM 時，乳鐵蛋白素的抗菌力會被抑制，故在本實驗欲探討之食品系統中，即絞碎豬後腿肉與貢丸，添加金屬螯合劑 (EDTA) 以減少食品系統中金屬離子的影響，並探討牛乳鐵蛋白水解物與金屬螯合劑的協同抗菌表現。

# 參、材料與方法

## 第一部分 牛乳鐵蛋白水解液的製備與抗菌性之探討

### 一、實驗材料

#### (一) 牛乳鐵蛋白水解液之製備

依 Hoek *et al.* (1997) 的方法進行牛乳鐵蛋白水解液之製備。

將牛乳鐵蛋白 (bovine lactoferrin; bLF) (由乳清分離，純度 97% 以上，水分 4%、灰分 0.5%、鐵結合能力 76% 以上) (DMV International, Veghel, the Netherlands) 溶於去離子水中 (5% w/v)，再以 1 N 的鹽酸 (hydrochloric acid; HCl; 聯工化學廠股份有限公司，新竹，台灣) 調整溶液的 pH 值至 2.5。加入 3% 胃蛋白酶 (pepsin A; EC 3.4.23.1; Sigma, USA) 並於 37°C 下反應 (E/S = 3%)，分別於 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180, 240, 300, 360 分鐘進行取樣，以 80°C 水浴 20 分鐘，終止酵素反應。將水解液以流水方式進行冷卻 (約 20°C) 後，利用 1 N 的氫氧化鈉 (sodium hydroxide; NaOH; 聯工化學廠股份有限公司，新竹，台灣) 調整溶液的 pH 值至 7.0。以冷凍離心機 (refrigerated centrifuge; himac SCR 20B, Hitachi, Tokyo, Japan) 於 4°C 下以 17,000 × g 離心 15 分鐘後，取上清液並凍存於 -20°C 下，備用。

## (二) 水解液之蛋白質定量分析

依 Bradford (1976) 的染劑結合方法 (dye-binding method)，採用分光光度法測定水解產物中蛋白質的含量。該方法是利用酸性染劑—Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBG) 可與蛋白質結合而變色的特性來定量。

當 CBG 與蛋白質結合後，其最大吸收波長會從原先的 465 nm 變為 595 nm (Reisner *et al.*, 1975; Sedmack *et al.*, 1977)。CBG 主要會與鹼性及芳香族胺基酸殘基結合，尤其會與精胺酸 (arginine) 結合 (Compton *et al.*, 1985)。若試樣中的蛋白質量較多，則結合到蛋白質而變色的 CBG 也多，因而呈色較深。

### 1. 反應試劑之配製

取 1 份的 Protein assay dye (Bio-Rad, California, USA) 加入 4 份的去離子水 (1:4; v/v) 的比例進行稀釋，再以 Whatman #1 濾紙過濾，去除未溶解的懸浮小顆粒後可保存在室溫下兩週。

### 2. 牛血清蛋白 (bovine serum albumin; BSA) 標準檢量曲線之製作

#### 2.1. 高濃度蛋白質溶液標準曲線

精秤 25 mg 牛血清蛋白 (bovine serum albumin; BSA; Sigma, USA), 以去離子水定量至 25 mL。各取 1, 2, 3, 4 及 5 mL 的原液 (1 mg/mL), 再以去離子水定量至 10 mL, 所得標準溶液之濃度分別為 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 及 0.5 mg/mL。

各取 10  $\mu$ L 不同濃度的標準溶液至 96 孔微量盤 (96-well polystyrene microtitre plates; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) 之各個槽內, 以三重複加入。每槽再加入 200  $\mu$ L 稀釋後的染劑, 在全部樣本槽加完前, 不要中斷添加; 同時小心避免氣泡產生 (本步驟是實驗成敗的關鍵! )。

輕拍微量盤一側, 使添加的各成份均勻混合, 因為染劑的密度較大, 很容易沉積在下方而分層。若有小氣泡存在, 則小心地以 tips 刺破。於室溫下反應 10 分鐘, 立即以 ELISA reader 測定 595 nm 下的吸光值, 以 10  $\mu$ L 的去離子水取代標準溶液作為空白對照組, 製作牛血清蛋白標準檢量曲線, 結果如圖十一所示。因為混合溶液的吸光值會隨反應時間的延長而上升, 因此, 混合溶液在室溫下的反應時間不得超過 1 小時。

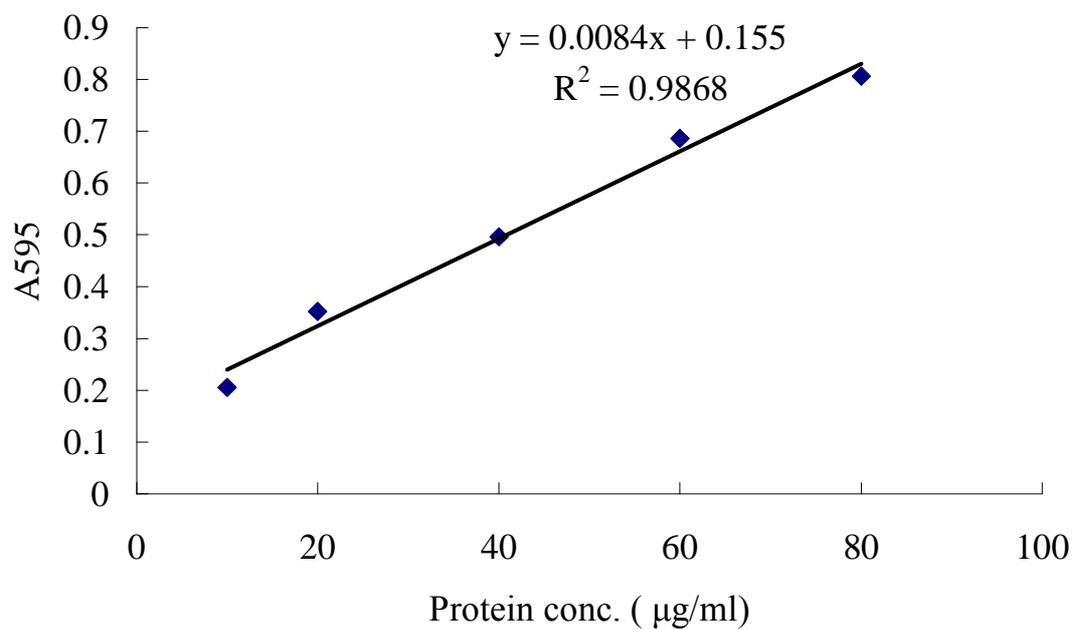
## 2.2. 低濃度蛋白質標準曲線

準備 3 至 5 個濃度在 8  $\mu\text{g/ml}$  到 80  $\mu\text{g/ml}$  之間，不同濃度的牛血清蛋白作為標準溶液（圖九）。取 160  $\mu\text{l}$  各標準溶液（或待測樣品）至 96 孔微量滴定盤的各凹槽中，再分別加入 40  $\mu\text{l}$  的蛋白質分析染劑，用微亮吸管充份混合均勻後，在室溫下反應至少 5 分鐘（隨時間增加吸光值會隨著增加，樣品勿在室溫下反應超過 1 小時），最後利用 ELISA reader 於波長 595 nm 下測定吸光值。

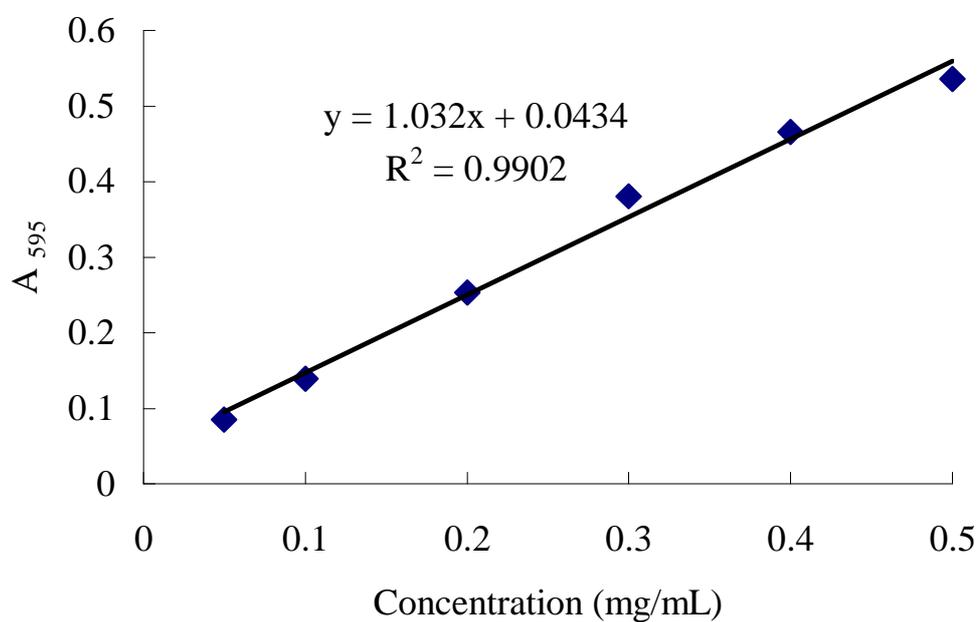
### 3. 測定步驟

各取 10  $\mu\text{L}$  適當稀釋後的水解液樣品至 96 孔微量盤之各個槽內，以三重複加入。每槽再加入 200  $\mu\text{L}$  稀釋後的染劑，輕拍滴定盤一側，使添加的各成份均勻混合後，於室溫下反應 10 分鐘，立即以 ELISA reader 測定 595 nm 下的吸光值，由牛血清蛋白標準檢量曲線換算水解液的總蛋白質質量。

(A)



(B)



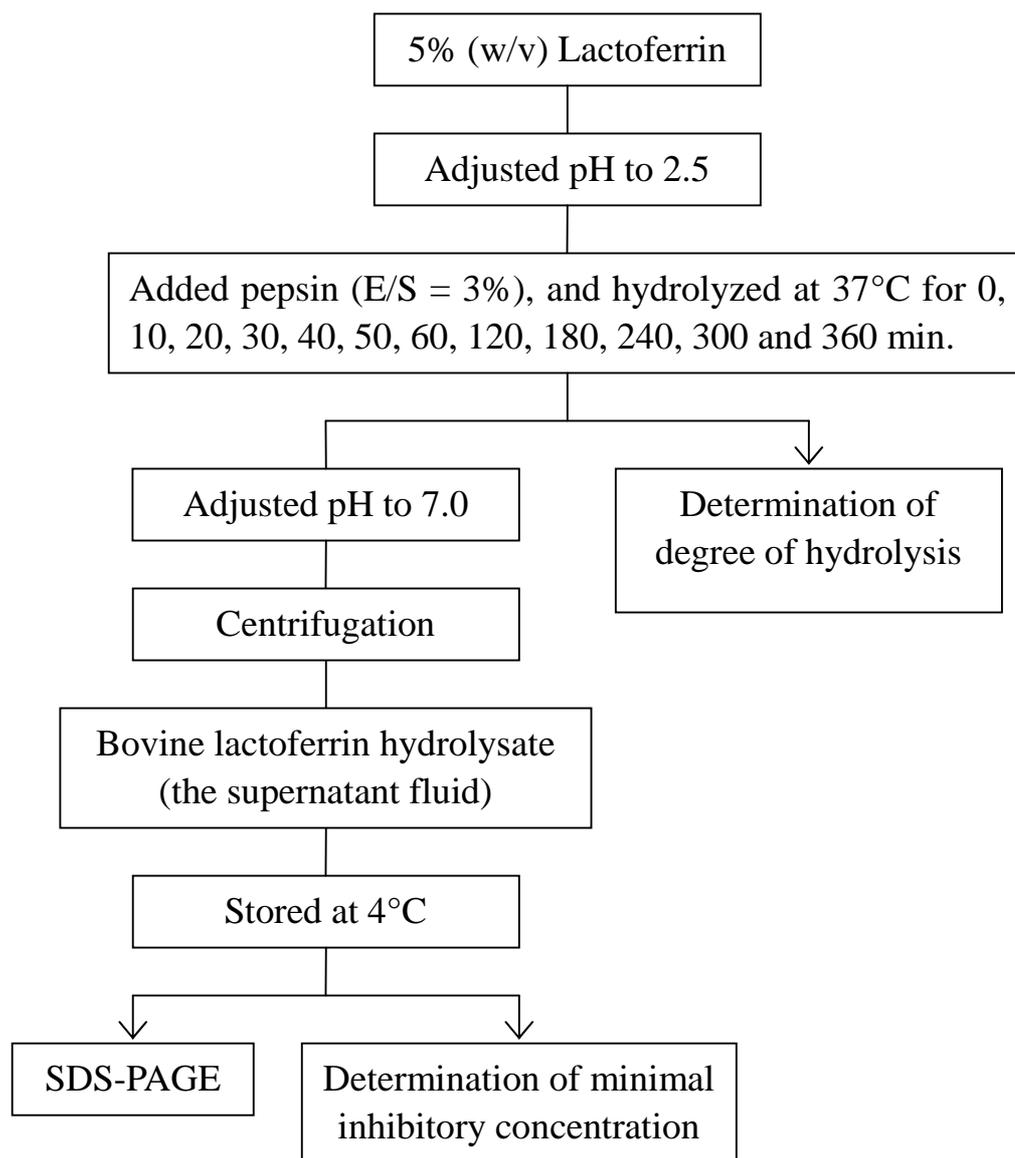
圖十一、牛血清蛋白標準檢量曲線。

Fig. 11. Standard curve for bovine serum albumin (BSA).

(A) 10-50 µg/ml (B) 0.05-0.5 mg/ml

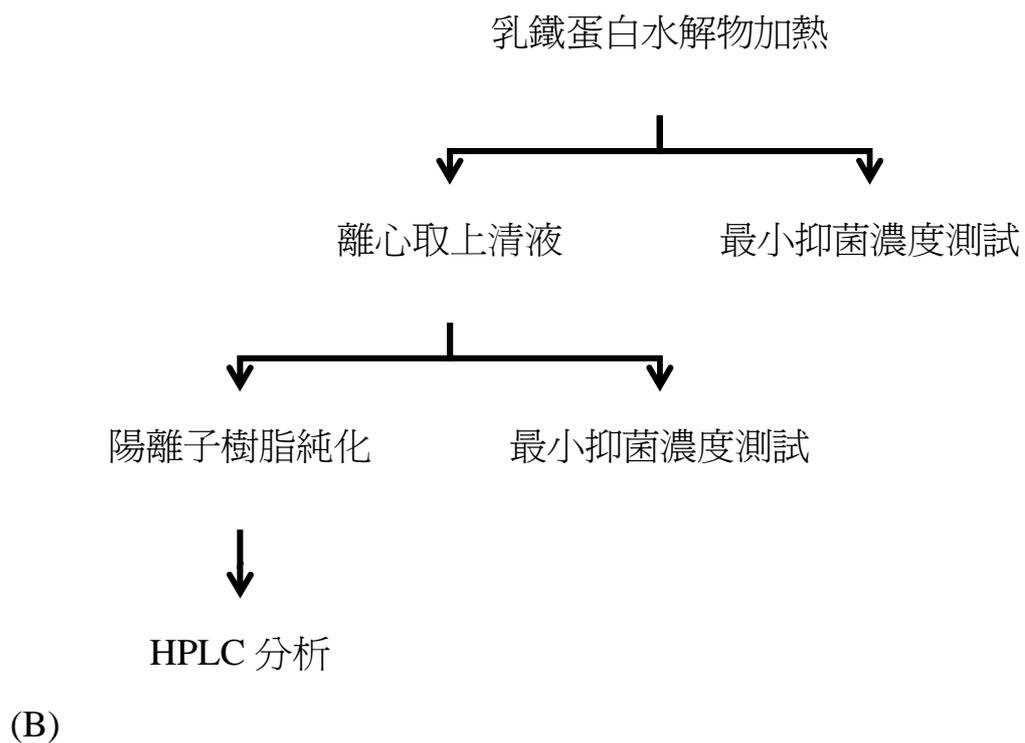
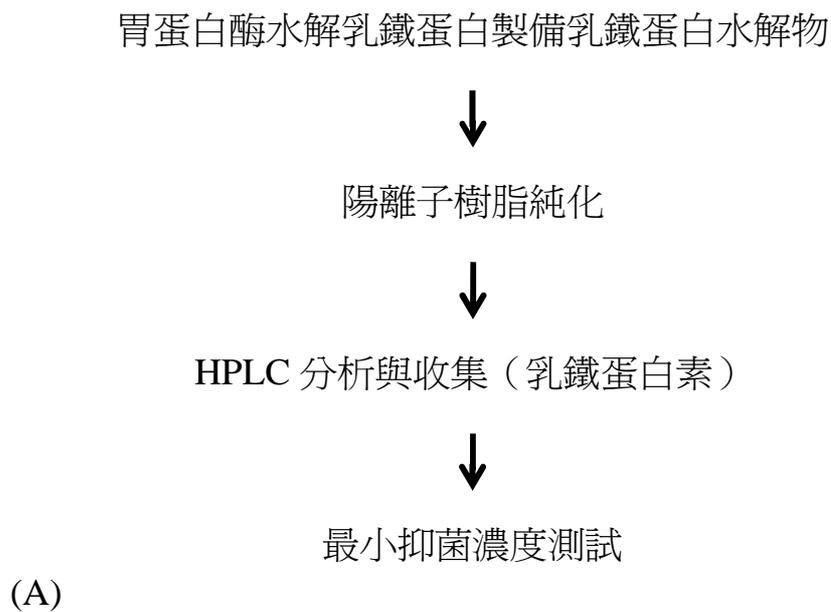
## 二、試驗設計

本實驗之試驗設計如圖十二及圖十三所示。



圖十二、牛乳鐵蛋白水解液的製備試驗流程圖。

Fig. 12. The flow chart of experimental design for bovine lactoferrin hydrolysate.



圖十三、牛乳鐵蛋白水解液的分析流程圖

Fig. 13. The flow chart of experimental design for bovine lactoferrin hydrolysate analysis.

### 三、分析項目

#### (一) 聚丙烯醯胺凝膠電泳 (分子量的測定)

##### 1. 試藥

鹽酸 (hydrochloric acid; HCl; 聯工化學廠股份有限公司, 新竹, 台灣)、氫氧化鈉 (sodium hydroxide; NaOH; 聯工化學廠股份有限公司, 新竹, 台灣)、30% Acrylamide/Bis (37.5: 1) (catalog 161-0158, Bio-Rad, California, USA)、三羥甲基氨基甲烷 (Tris base; USB, OHIO)、三羥甲基氨基甲烷酸鹽 (Tris hydrochloride; Tris-HCl; J. T. Baker, USA)、十二烷基硫酸鈉 (sodium dodecyl sulfate; SDS; Sigma, USA)、過硫酸銨 (ammonium persulfate; APS; catalog 161-0700, Bio-Rad, California, USA)、四甲基乙二胺 (tetramethylenediamine; TEMED; catalog 161-0800, Bio-Rad, California, USA)、甘油 (glycerol; USB, OHIO)、2-巰硫乙醇 (2-mercaptoethanol; Merck, Germany)、溴酚藍 (bromophenol blue; Sigma, USA)、甘氨酸 (glycine; catalog 161-0718, Bio-Rad, California, USA)、孔孟欣亮藍染色劑 R-250 (coomassie brilliant blue R-250; catalog 161-0400, Bio-Rad, California, USA)、醋酸 (acetic acid; 島久藥

品株式會社，大阪，日本)、甲醇 (methanol; Mallinckrodt Chemicals, USA)

## 2. 試劑之配製 (見表七)

## 3. 膠體之製備

a) 將 sample buffer 與樣品以 1 : 2 (sample: buffer) 的比

例混合，並在 95°C 的沸水中加熱 4 分鐘。

b) 配製 10 mL 5% 分離膠體 (separating gel; resolving gel)

(見表八)。

c) 配製 50 mL 16% 焦集膠體 (stacking gel) (見表八)。

## 4. 電泳裝置的組裝及操作

a) 電泳裝置 (Mini-PROTEAN 3 Cell; catalog 165-3301,

Bio-Rad, California, USA) 的玻璃片組裝完成後，將分

離膠體溶液緩緩注入 (勿使氣泡產生)，注膠高度約 8

分滿。注膠後，緩緩加入 100% 酒精以壓平膠體表面。

b) 待膠體凝固後 (約 30 分鐘)，將 100% 酒精倒掉，並以

濾紙吸乾殘留在膠體上方的 100% 酒精。接著，緩緩

注入 5% 焦集膠體溶液至液面與玻璃板等高，隨即以

45° 斜角插入樣品槽齒模 (comb, 10 well, 0.75 mm)。

表七、 電泳程序所使用之溶液。

Table 7. Buffer for protein electrophoresis.

| 名稱  | 成份   | 添加量   | 最終體積   | 儲存條件         |
|---|--|---|--------|--------------|
| 30% Acrylamide/Bis<br>(37.5: 1)                                 | -  | -   | -      | 4°C          |
| 分離膠體緩衝液<br>Resolving gel buffer<br>(1.5 M Tris-HCl)<br>(pH 8.8) | Tris base (分子量 121.14)<br>DDW  | 18.15 g                                       | 100 mL | 4°C          |
| 聚焦膠體緩衝液<br>Stacking gel buffer<br>(0.5 M Tris-HCl)<br>(pH 6.8)  | Tris-HCl (分子量 157.60)<br>DDW   | 7.88 g  | 100 mL | 4°C          |
| 10% (w/v) APS   | APS<br>DDW   | 0.1 g   | 1 mL   | 當日新鮮配製 (需避光) |
| 電泳緩衝液<br>10× Electrode (running)<br>buffer (pH 8.3)             | Tris<br>Glycine<br>SDS<br>DDW  | 30.3 g<br>144.0 g<br>10 g                     | 1 L    | 常溫           |
| 樣品緩衝液<br>Sample buffer (SDS<br>reducing buffer)                 | 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)<br>Glycerol<br>10% SDS<br>0.5% (w/v) Bromophenol<br>blue<br>2-mercaptoethanol<br>DDW | 1.25 mL<br>2.5 mL<br>2 mL<br>0.2 mL<br>0.5 mL | 10 mL  | 常溫           |
| 染色液<br>Staining solution  | Coomassie brilliant blue<br>R-250<br>40% (v/v) methanol<br>10% acetic acid<br>DW                             | 2.5 g<br>225 mL<br>50 mL                      | 500 mL | 常溫           |
| 脫色液<br>Destaining solution                                      | 40% (v/v) methanol<br>10% acetic acid<br>DW  | 225 mL<br>50 mL                               | 500 mL | 常溫           |

表八、 鑄膠配方。

Table 8. Gel formulations (10 mL monomer solution)

| Percent Gel | DDW (mL) | 30% Degassed acrylamide/Bis (mL) | *Gel Buffer (mL) | 10% (w/v) SDS (mL) |
|-------------|----------|----------------------------------|------------------|--------------------|
| 4 %         | 6.1      | 1.3                              | 2.5              | 0.1                |
| <b>5 %</b>  | 5.7      | 1.7                              | 2.5              | 0.1                |
| 6 %         | 5.4      | 2.0                              | 2.5              | 0.1                |
| 7 %         | 5.1      | 2.3                              | 2.5              | 0.1                |
| 8 %         | 4.7      | 2.7                              | 2.5              | 0.1                |
| 9 %         | 4.4      | 3.0                              | 2.5              | 0.1                |
| 10 %        | 4.1      | 3.3                              | 2.5              | 0.1                |
| 11 %        | 3.7      | 3.7                              | 2.5              | 0.1                |
| 12 %        | 3.4      | 4.0                              | 2.5              | 0.1                |
| 13 %        | 3.1      | 4.3                              | 2.5              | 0.1                |
| 14 %        | 2.7      | 4.7                              | 2.5              | 0.1                |
| 15 %        | 2.4      | 5.0                              | 2.5              | 0.1                |
| 16 %        | 2.1      | 5.3                              | 2.5              | 0.1                |
| 17 %        | 1.7      | 5.7                              | 2.5              | 0.1                |
| <b>20 %</b> | 0.7      | 6.7                              | 2.5              | 0.1                |

\*Resolving gel buffer: 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8.

\*Stacking gel buffer: 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8.

Immediately prior to pouring the gel, add (for 10 mL monomer solution):

Resolving gel buffer: 50  $\mu$ L 10% APS and 5  $\mu$ L TEMED

Stacking gel buffer: 50  $\mu$ L 10% APS and 10  $\mu$ L TEMED

Swirl gently to initiate polymerization.

注意：不可有氣泡陷在膠體中。

- c) 待膠體凝固後 (約 30 分鐘)，將樣品槽齒模取下，並將含膠體的玻璃片組架到電泳裝置上，並將電泳緩衝液倒入電泳槽中。
- d) 以微量吸管吸取標準品 (marker) (catalog 161-0326 and 161-0317, Bio-Rad, California, USA) 及樣品 (蛋白質變性液)，注入聚焦體的各個凹槽 (well) 中。

注意：蛋白質濃度要一致。

| Marker A (catalog 161-0326) |                       |
|-----------------------------|-----------------------|
| Protein                     | Molecular weight (kD) |
| Triosephosphate isomerase   | 26.625                |
| Myoglobin                   | 19.95                 |
| $\alpha$ -Lactoalbumin      | 14.437                |
| Aprotinin                   | 6.512                 |
| Insulin b chain, oxidized   | 3.496                 |
| Bacitracin                  | 1.423                 |

| Marker B (catalog 161-0317) |                       |
|-----------------------------|-----------------------|
| Protein                     | Molecular weight (kD) |
| Myosin                      | 200                   |
| $\beta$ -galactosidase      | 116.25                |
| Phosphorylase b             | 97.4                  |
| Serum albumin               | 66.2                  |
| Ovalbumin                   | 45                    |
| Carbonic anhydrase          | 31                    |
| Trypsin inhibitor           | 21.5                  |
| Lysozyme                    | 14.4                  |
| Aprotinin                   | 6.5                   |

e) 蓋上電泳槽蓋，接上電極（黑色為負極；紅色為正極），連接並啟動電泳電源供應器（power supply）(PowerPac 300, Bio-Rad, California, USA)，進行電泳。

註：聚焦膠體使用電壓為 70 V；分離膠體使用電壓為 140 V。

f) 當藍色指示劑達到距離膠體底部約 0.5 公分的位置時，關掉電源供應器，停止電泳。

g) 利用起膠片割去聚焦膠體後，再以起膠片取出分離膠體置入染色盒（內含 300 mL 染色液）中，在往覆式震盪器（50 rpm）上進行 30-60 分鐘的染色。

h) 回收染色液，倒入 300 mL 的脫色液，在往覆式震盪器（50 rpm）上進行脫色程序。

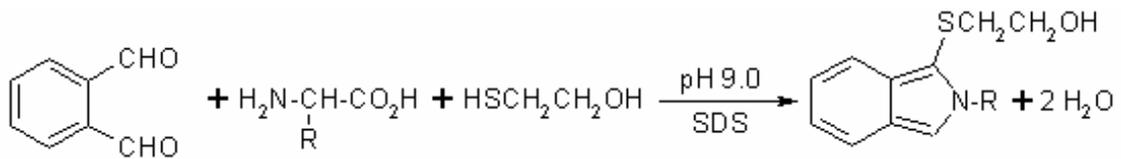
註：每隔 10-15 分鐘就要換一次脫色液，直到膠體的背景色退色為止。

i) 利用電腦掃描脫色完的膠體，保存檔案。

## (二) 水解度 (degree of hydrolysis; DH) 之測定

依 Church *et al.* (1983) 的方法，採用 *o*-Phthaldialdehyde (OPA) 分光光度法測定水解產物中胺基的含量。OPA 分光光度法在分析蛋白質水解測試上的應用，是測量蛋白質中  $\alpha$ -胺基的釋出量，為一種快速、方便且敏感的測定方法。

*o*-Phthaldialdehyde (OPA) 及  $\beta$ -mercaptoethanol 會與一級胺 (primary amines) 反應，並生成在 340 nm 下有強烈吸光性之產物 (1-alkylthio-2-alkylisoindole)。反應式如下：



R 代表反應胺基酸、胜肽或含有一級胺的蛋白質。

可溶性蛋白水解酶的分析重點在於何時該將酶做不活化的處理。OPA 試劑中所含的 1% SDS 不只是用來將受質（蛋白質）變性以確保反應能完全進行，以得到我們想要的胺基，而且在大多數的例子中，SDS 可以用來中止酶水解反應。因此，利用 OPA 分光光度法監控蛋白質水解情形，十分方便。

### 1. OPA 混合試劑之配製（需當日現配）

取 12.5 mL 之 100 mM 四硼酸二鈉 (di-sodium tetraborate decahydrate; Merck, Germany)、1.25 mL 之 20% (w/w) 十二烷基硫酸鈉 (sodium dodecyl sulfate; SDS; Sigma, USA)、0.5 mL 的鄰苯二甲醛 (*o*-phthaldialdehyde; OPA; Merck, Germany)；將 20 mg OPA 溶於 0.5 mL 的甲醇 (Mallinckrodt Chemicals, USA) 和 50  $\mu$ L 的 2-巰硫乙醇 (2-mercaptoethanol; Merck, Germany)，用棕色瓶定量至 25 mL。

## 2. 測定步驟

測定前將牛乳鐵蛋白水解液以去離子水進行 50 倍稀釋，使  $A_{340}$  介於 0-1 之間。測定時取稀釋後的水解液樣品 100  $\mu\text{L}$ ，直接加入 1 mL 現配的 OPA 混合試劑中，均勻混合後，於室溫下反應 2 分鐘，接著，立即以分光光度計 (spectrophotometer; Spectronic genesys 5, Milton roy company, New York, USA) 測定 340 nm 下的吸光值，並由下列計算公式換算成水解率。

水解率的計算公式如下：

$$\text{DH} = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100\%$$

$$h = \frac{\Delta A_{340 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}}}{\epsilon \text{MF}}$$

$h$  是水解物中的胜肽鍵斷鍵數，即  $\alpha$ -胺基的釋出量； $h_{\text{tot}}$  是等量蛋白質中胜肽鍵的總數； $\epsilon = 6000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ； $M$  為莫耳蛋白質濃度； $F$  為稀釋因子 (根據分析步驟)； $\Delta A_{340 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}}$  為實驗過程中吸光值的改變量。

例：本實驗測得未水解之牛乳鐵蛋白的  $A_{340}$  為 0.417，而水解 4 小時之牛乳鐵蛋白水解液的  $A_{340}$  為 0.760，則  $\Delta A_{340 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}} =$

$0.760 - 0.417 = 0.343$ 。牛乳鐵蛋白的分子量為 18176.47，由於本實驗水解之牛乳鐵蛋白溶液的濃度為 5%，故  $M = 0.00064$ 。

測定前先將水解液做 50 倍稀釋，測定時取稀釋後的水解液 100  $\mu\text{L}$ ，直接加入 1 mL 現配的 OPA 混合試劑中，此時水解液又被

稀釋 11 倍，故  $F = \frac{1}{50 \times 11} = \frac{1}{550}$ 。  $\epsilon = 6000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。

$$h = \frac{\Delta A_{340\text{nm}}^{1\text{cm}}}{\epsilon MF} = \frac{0.343 \times 550}{6000 \times 0.00064} = 49.11220$$

由於一個牛乳鐵蛋白分子是由 708 個胺基酸殘基所組成，故

$$h_{\text{tot}} = 707。$$

$$\text{DH} = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100\% = \frac{49.11220}{707} \times 100\% = 6.95\%$$

(三) 最小抑菌濃度 (minimal inhibitory concentration; MIC) 之測

定

### 1. 受試菌株之活化

以沾有 70% 酒精的棉花擦拭冷凍乾燥管之外管，在火焰上加熱外管之尖端。滴數滴無菌水於加熱處使外管破裂，再以硬棒敲破尖端。取出隔熱纖維紙和內管，以滅菌過的鑷子取出內管之棉塞。用接種環沾取內管中的乾燥菌株粉末至 6 mL 以滅菌之指

定液態培養基，*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14207 (食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，新竹，台灣) 使用腦心浸出液 (brain heart infusion; BHI broth; Cat. No. 237500, Difco, USA)，*Staphylococcus aureus* ATCC 9144 (食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，新竹，台灣) 則使用營養汁培養基 (nutrient broth; NB; Cat. No. 234000, Difco, USA)。待乾燥菌株粉末溶解後，輕微震盪使其均勻。將內管、棉塞及隔熱纖維紙依序放回外管後，以 parafilm 封住外管口，並冷藏於-20°C。以 pipettman 吸取 100 µL 的菌液於指定之平板培養基上，*P. aeruginosa* ATCC 14207 使用腦心浸出液 (brain heart infusion agar; BHI agar; Cat. No. 241830, Difco, USA)，*S. aureus* ATCC 9144 則使用營養汁瓊脂 (nutrient agar; NA; Cat. No. 213000, Difco, USA)，再用無菌 L 型玻棒均勻塗抹，待培養基表面之菌液完全被吸收後，將培養皿倒置培養於 37°C 恆溫培養箱 (光勝儀器製作所，台北，台灣) 中 24-48 小時，以檢驗菌種的純度及活化情形。以接種環挑選一獨立菌落至指定之斜面培養基 (6 mL)，*P. aeruginosa* ATCC 14207 使用 BHI agar，*S. aureus* ATCC 9144 則使用 NA，並培養於 37°C 恆溫培養箱中 24 小時後，保存於 4°C 下。

## 2. 受試菌株生長曲線之製作

自斜面培養基上取一接種環的菌量，次培養於 6 mL 指定之液態培養基中，*P. aeruginosa* ATCC 14207 使用 BHI broth，*S. aureus* ATCC 9144 則使用 NB，並震盪培養 (120 rpm) 於 37°C 下 18 小時 (此時 *P. aeruginosa* ATCC 14207 的濃度約為  $2.8 \times 10^9$  CFU/mL；*S. aureus* ATCC 9144 的濃度約為  $5.6 \times 10^8$  CFU/mL)。取 1 mL 經適當稀釋之接種菌液 (使菌液濃度為  $10^6$ - $10^7$  CFU/mL) 至含 100 mL 指定液態培養基的三角錐形瓶中，*P. aeruginosa* ATCC 14207 使用 BHI broth，*S. aureus* ATCC 9144 則使用 NB，輕微震盪使其均勻。以 pipettman 吸取 1 mL 的含菌液態培養基至 cuvette 中，以分光光度計測定 600 nm 下的吸光值，以 1 mL 的指定液態培養基作為空白對照組。將剩下的含菌液態培養基置於 37°C 恆溫震盪水浴器 (shaking bath; RCB-411, Kansin Instruments Co., Ltd., Taiwan) 中震盪培養 (120 rpm)。其後每隔 30 分鐘吸出 1 mL 的含菌液態培養基至 cuvette 中，並以分光光度計測定 600 nm 下的吸光值，直至菌體生長情形達平穩期。當菌體生長情形進入對數生長期後，每隔 1 小時以 pipettman 吸取 100  $\mu$ L 經適當系列稀釋的含菌液態培養基於指定之平板培養基上，用無菌 L 型玻棒均勻塗抹，待培養基表面之

菌液完全被吸收後，將培養皿倒置培養於 37°C 恆溫培養箱中 24-48 小時，直至菌體生長情形達平穩期。每一時間點選菌落數適中的培養皿計算菌落數，乘以稀釋倍數，計算原液中每 mL 之菌數。以時間為 X-軸，A<sub>600</sub> 為 Y-軸作圖，結果如圖十四 (A) 及圖十五 (A) 所示。另以 A<sub>600</sub> 為 X-軸，菌數取對數值為 Y-軸作圖，結果如圖十四 (B) 及圖十五 (B) 所示。

### 3. 測定步驟

依 Nonnecke and Smith (1984) 的方法進行最小抑菌濃度測定。

自斜面培養基上取一接種環的菌量，次培養於 6 mL 指定之液態培養基中，*P. aeruginosa* ATCC 14207 使用 BHI broth，*S. aureus* ATCC 9144 則使用 NB，並震盪培養 (120 rpm) 於 37°C 下 18 小時。取 0.1 mL 經適當稀釋之接種菌液 (使菌液濃度為 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> CFU/mL) 至含 10 mL 新鮮的指定液態培養基中，*P. aeruginosa* ATCC 14207 使用 BHI broth，*S. aureus* ATCC 9144 則使用 NB，輕微震盪使其均勻後，置於 37°C 恆溫震盪水浴器中震盪培養 (120 rpm)，直至菌體生長情形達 mid-log phase，*P. aeruginosa* ATCC 14207 約培養 8 小時 (參照圖十三 (A))，*S.*

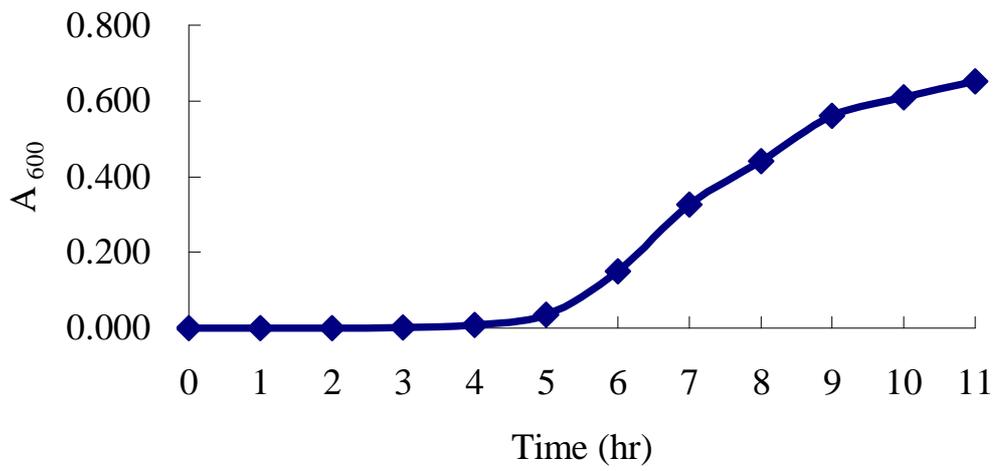
*aureus* ATCC 9144 則約培養 6 小時 (參照圖十四 (A)) 後，以 pipettman 吸取 1 mL 的含菌液態培養基至 cuvette 中，分別以分光光度計測定 600 nm 下的吸光值，並利用圖十三 (B) 及圖十四 (B) 分別換算出 *P. aeruginosa* ATCC 14207 及 *S. aureus* ATCC 9144 的菌液濃度，接著以無菌去離子水將菌液稀釋至大約  $10^4$  CFU/mL。

由於不同水解時間之牛乳鐵蛋白水解液的起始濃度介於 7-12 mg/mL 之間 (未水解之牛乳鐵蛋白的濃度則介於 49-50 mg/mL 之間)，故測定前，先將各水解液以無菌去離子水稀釋調整至相同濃度 (4 mg/mL) (未水解之牛乳鐵蛋白則調整濃度至 32 mg/mL)，再以無菌去離子水將各水解物進行 2 倍系列稀釋，本實驗所使用的測試濃度為 0、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 及 4.0 mg/mL (未水解之牛乳鐵蛋白的測試濃度則為 0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 mg/mL)。

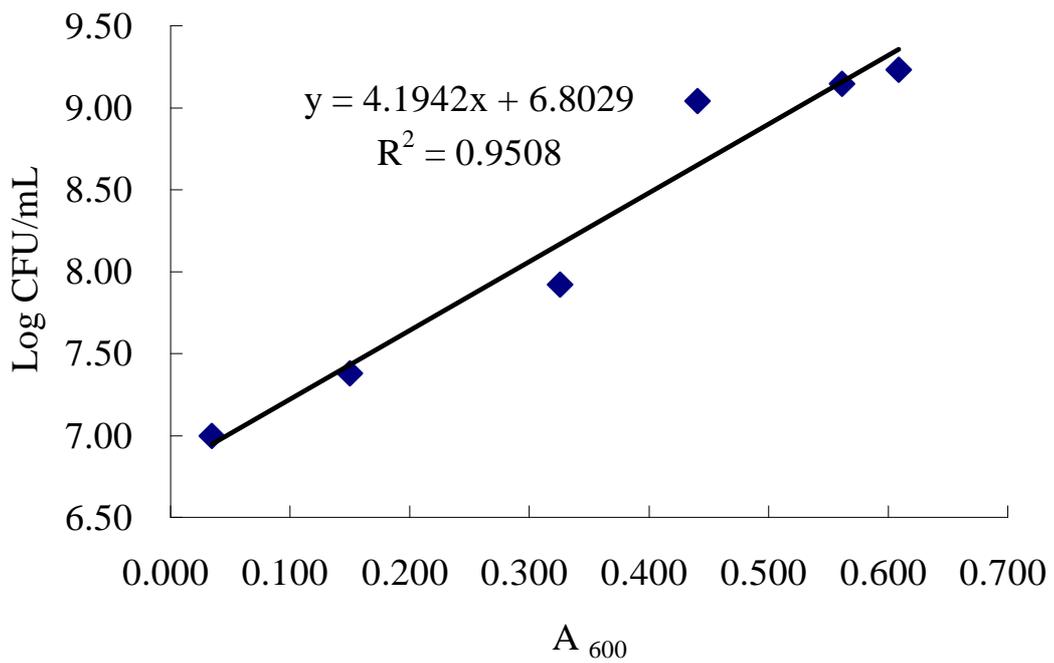
在 96-well tissue culture plates 的每個 well 中加入 190  $\mu$ L 指定之液態培養基 (*P. aeruginosa* ATCC 14207 使用 BHI broth，*S. aureus* ATCC 9144 則使用 NB)、50  $\mu$ L 經 2 倍系列稀釋之牛乳鐵蛋白水解液 (或未水解之牛乳鐵蛋白) 以及 10  $\mu$ L 的稀釋菌液。

蓋上 96-well tissue culture plates 的蓋子，培養於 37°C 恆溫培養箱中 18-24 小時後，測定在 620 nm 下的吸光值。

另作生長控制組、空白試驗組及水解物空白試驗組。生長控制組是以無菌去離子水取代水解液的添加；空白試驗組則以無菌去離子水取代水解液及菌液的添加；水解物空白試驗組是以無菌去離子水取代菌液的添加，目的為扣除水解液本身造成的濁度干擾。抗菌活性以肽的 MIC ( $A_{620}$  沒有增加) 來表示。



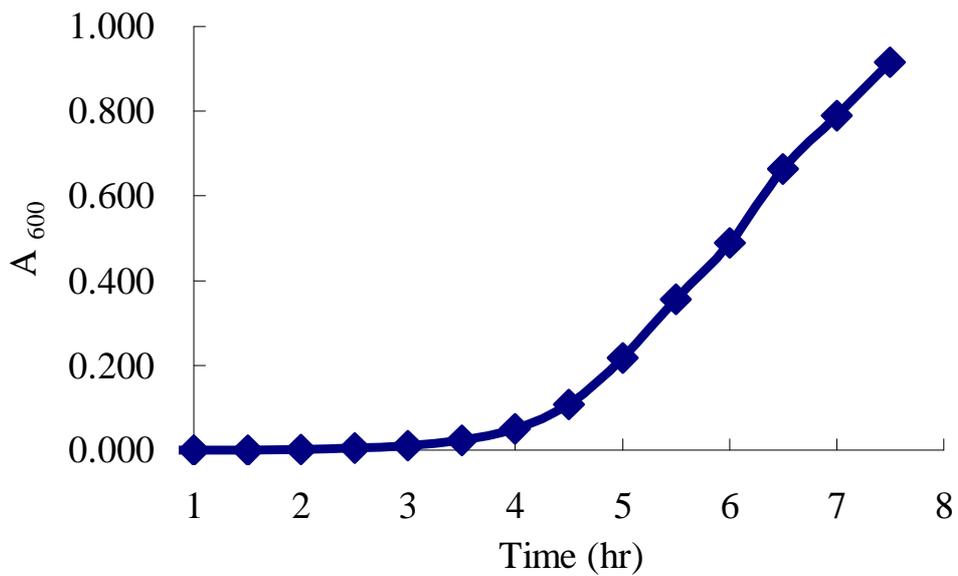
(A)



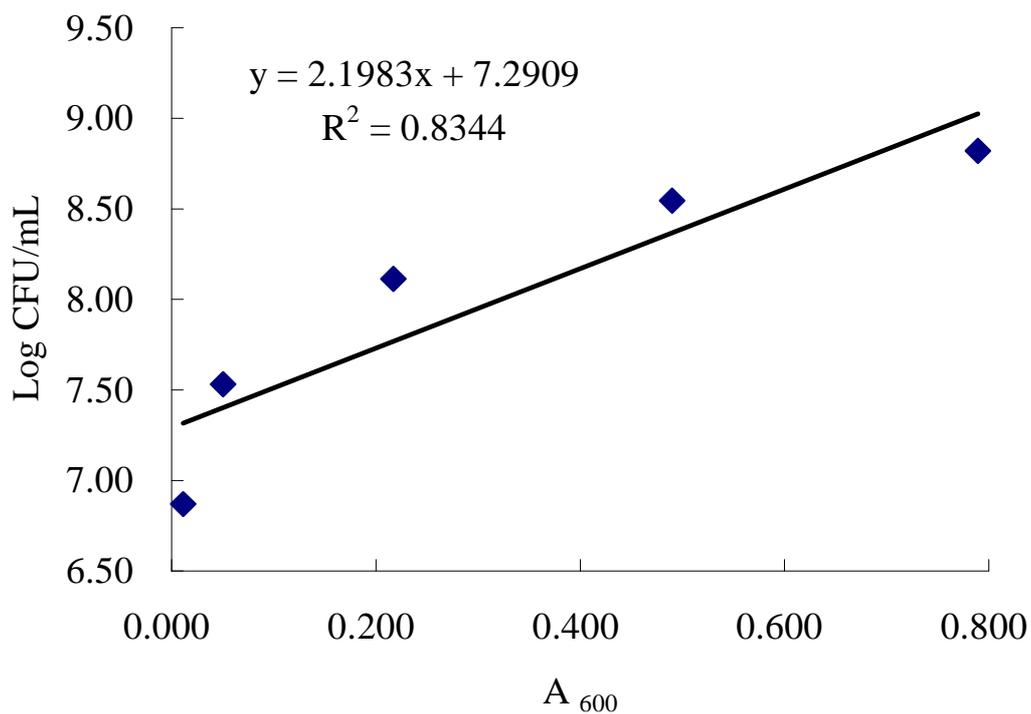
(B)

圖十四、假單胞桿菌的生長曲線。

Fig. 14. The growth curve of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14207.



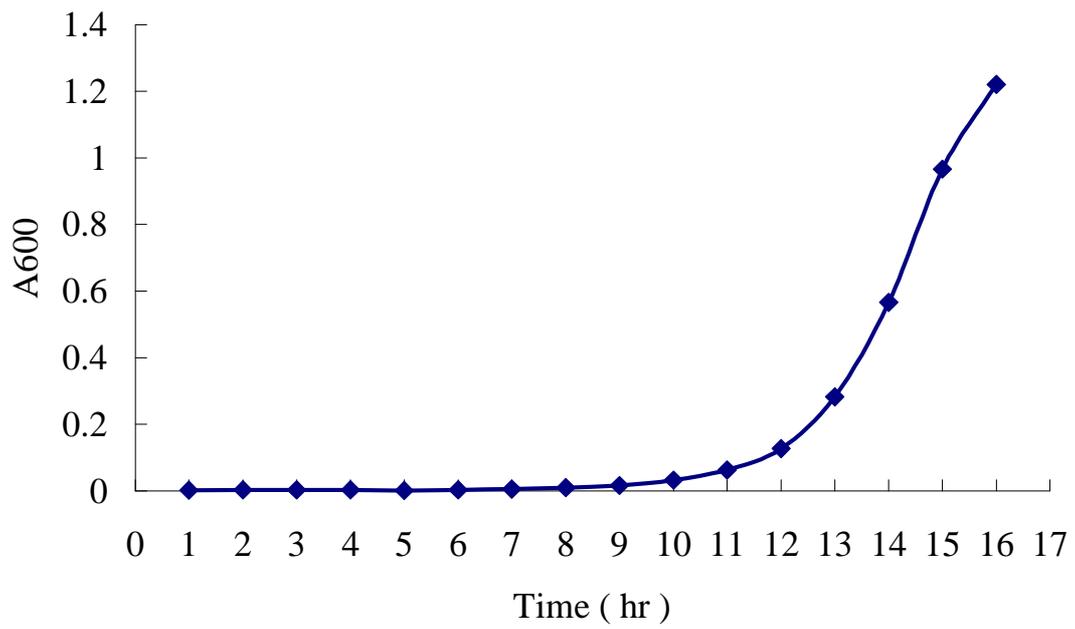
(A)



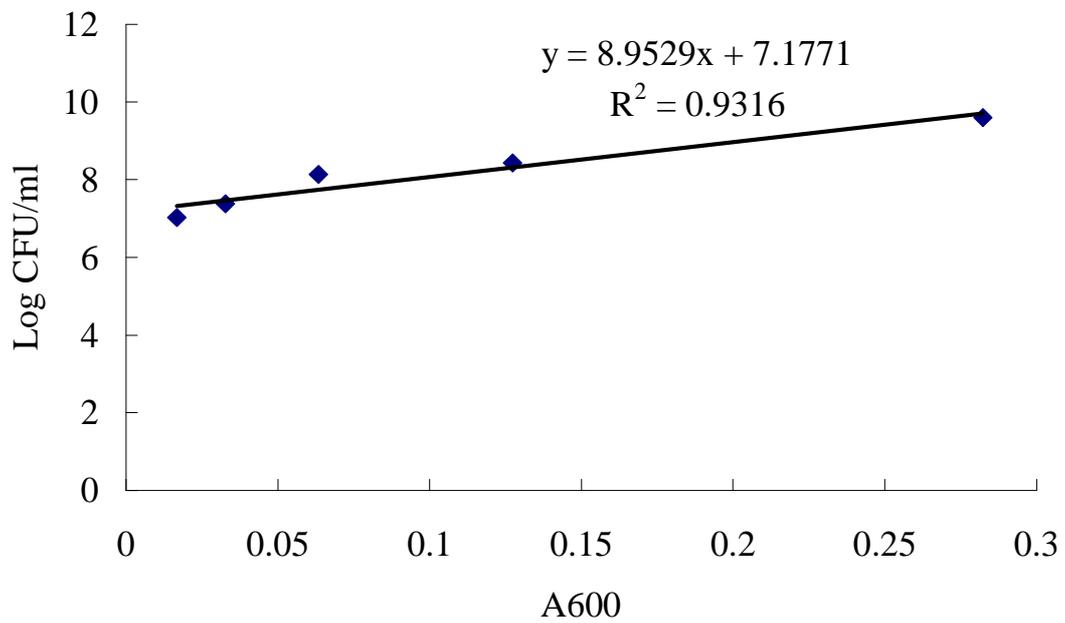
(B)

圖十五、金黃葡萄球菌的生長曲線。

Fig. 15. The growth curve of *Staphylococcus aureus* ATCC 9144.



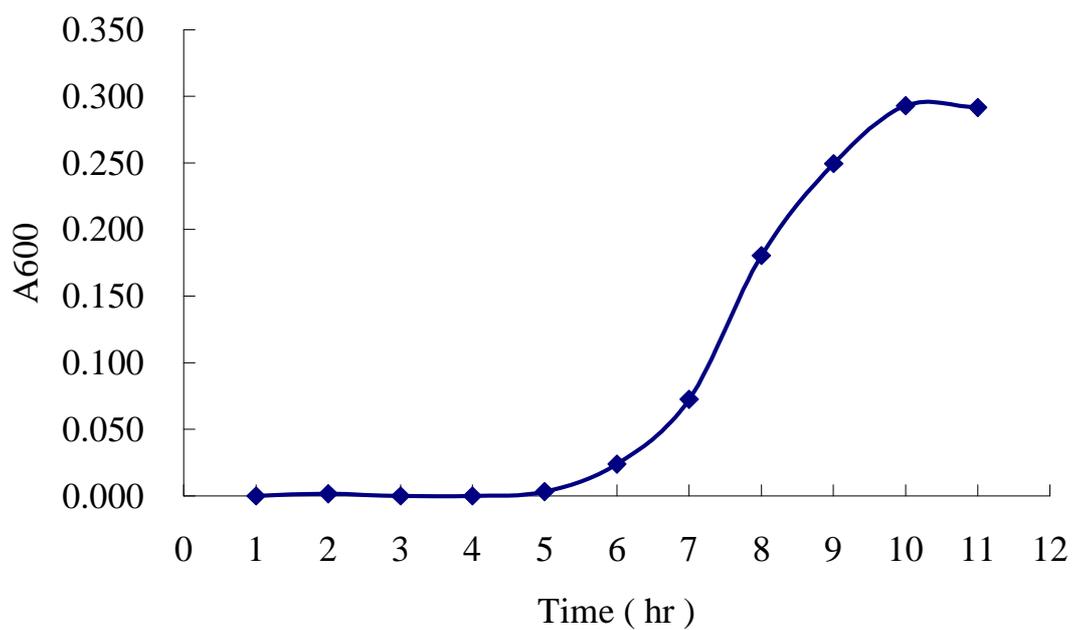
(A)



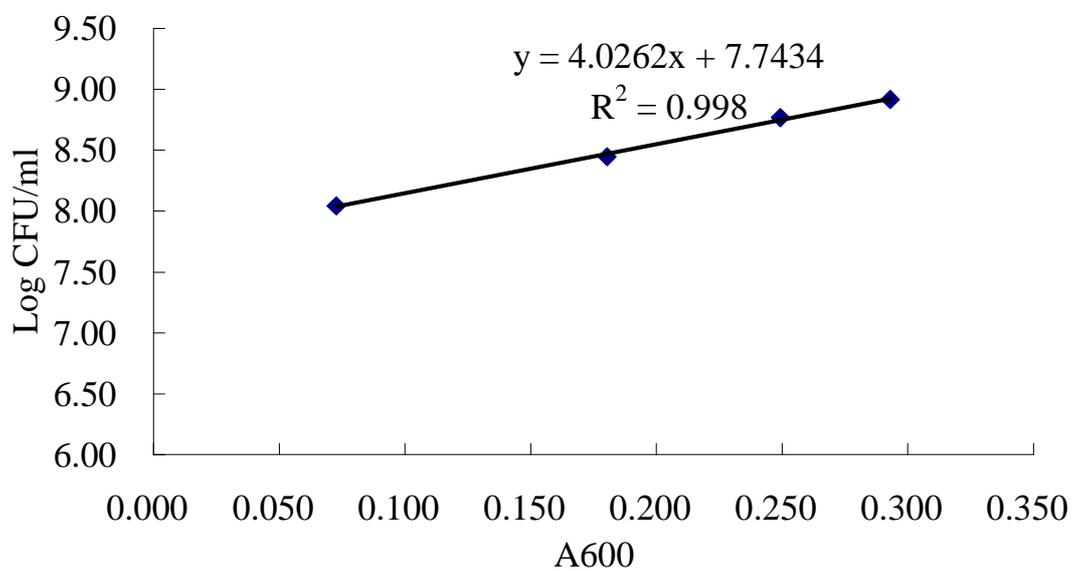
(B)

圖十六、李斯特菌的生長曲線。

Fig. 15. The growth curve of *Listeria monocytogenes* ATCC19111.



(A)



(B)

圖十七、李斯特菌的生長曲線。

Fig. 17. The growth curve of *Listeria monocytogenes* ATCC19111.

#### (四) 陽離子交換樹脂純化

##### 1. 試劑之配製

###### (1) 0.05M 之磷酸鈉緩衝液，pH 7.0

###### A. 0.05M 磷酸二氫鈉水溶液。

秤取 3.55 g 的磷酸二氫鈉 (disodium hydrogen phosphate, 島久藥品株式會社, 大阪, 日本) 以去離子水定量至 500 ml

###### B. 0.05M 磷酸氫二鈉水溶液。

秤取 3.45 g 的磷酸氫二鈉 (sodium dihydrogen phosphate, 島久藥品株式會社, 大阪, 日本) 以去離子水定量至 500 ml

以 A 溶液為主要溶液，緩慢加入 B 溶液且同時利用磁石攪拌均勻混合，調整混合液至 pH 7.0，作為沖提離子交換管柱之移動相。

###### (2) 1N NaCl 0.05M 磷酸緩衝液，pH 7.0

秤取 58.44 g 的氯化鈉 (sodium chloride, 島久藥品株式會社, 大阪, 日本) 以上述步驟(1)所配製之磷酸緩衝液定量至 1000 ml，作為沖提離子交換管柱之移動相。

###### (3) 20% 甲醇水溶液

取 200 ml 之甲醇 (methanol, >99.9% w/w, Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, USA) 以去離子水定量至 1000 ml，使用過濾，於超音波振盪器中除去液體中的空氣 (Degas)，用來清洗膠體管柱。

## 2. 樣品配製

將加熱 0, 5 及 10 分鐘後之乳鐵蛋白水解物，在 4 °C 下以 12,000 rpm 離心 15 分鐘，取其上清液（去除因加熱形成之沉澱物），進行後續管柱層析之初步純化。

## 3. 管柱充填

玻棒斜靠裝柱容器內壁，將陽離子交換樹脂（Source 30S, GE Healthcare, Uppsala, Sweden）沿著玻棒倒入管柱內，可減少裝填時產生氣泡，靜置四至六小時使凝膠緊密，重覆前述步驟，使凝膠裝填至約 15 cm 高度，組合柱頭上蓋並連接蠕動幫浦，以 20% 甲醇水溶液調整流速 5 ml/min 沖提管柱，使膠體緊密穩定即裝填完成。

## 4. 實驗步驟

先以 0.05M 鄰酸鈉緩衝液、流速 5 ml/min 沖提 2 倍管柱體積後，使管柱內充滿移動相為 0.05M 磷酸鈉緩衝液，注入 3 ml 經過處理之樣品，先使用磷酸緩衝液以流速 5 ml/min 沖提 15 分鐘後，再使用含 1N NaCl 0.05M 的磷酸緩衝液以流速 5 ml/min 沖提，利用自動分液收集器每 1 分鐘收集一次，於分光光度計波長 280 nm 下測定其吸光值。

## (五) 高效液相層析之分析與收集

### 1. 試劑的配製

#### (1) 0.03%三氟醋酸水溶液

取 0.6 ml 的三氟醋酸 (trifluoroacetic acid, Sigma, St. Louis, USA) 加入 2000ml 的去離子水中混合均勻，利用 0.45  $\mu\text{m}$  纖維酯濾膜 (Mixed cellulose ester membrane filters, pore size : 0.45  $\mu\text{m}$ , diameter : 47 mm, Advantec MFS, C.A., USA) 抽氣過濾去除雜質後，以超音波振盪 (Bransonic 5510R-DTH, Danbury, USA) 除氣。

#### (2) 90%乙腈之 0.03%三氟醋酸水溶液

取 100 ml 試劑(1)與 900 ml 的乙腈均勻混合，利用 0.45  $\mu\text{m}$  尼龍濾膜 (Nylon membrane filter, pore size : 0.45  $\mu\text{m}$ , diameter : 47 mm, Pall, Michigan, USA) 抽氣過濾去除雜質後，以超音波振盪除氣。

### 2. 實驗步驟

將經過陽離子交換樹脂純化後所收集的樣品溶液，參考 Hoek (1997) 等人的研究分析條件，利用高效液相層析儀 (HP 1100 Series HPLC system, Hewlett Packard co., Waldbronn, Germany) 進行分析，先以分析行高效液相層析找尋適當的分離條件，比對文獻所測試的結果，再利用製備型高效液相層析純化分離，收集具抑菌效果的抗菌肽，再進行抑菌測試。高效液相層析條件如下述：

(1) 分析型高效液相層析

管 柱：Synergi 4 $\mu$  Fusion-RP 80 (Phenomenex, CA, USA)

管柱規格：4.6  $\times$  250 mm, 4 micron

樣品注入：20  $\mu$ l

梯 度：

---

移動相 (mobile phase)

---

| 時間 (min) | 試劑(1) (%) | 試劑(2) (%) |
|----------|-----------|-----------|
| 0        | 80        | 20        |
| 20       | 80        | 20        |
| 50       | 50        | 50        |

---

流 速：1 ml/min

偵 測 器：280 nm

(2) 製備型高效液相層析

管 柱：HyperClone 5 $\mu$  ODS (C18) (Phenomenex, CA, USA)

管柱規格：21.2 (i.d.)  $\times$  250 mm, 5 micron

樣品注入：500  $\mu$ l

梯 度：

---

移動相 (mobile phase)

---

| 時間 (min) | 試劑(1) (%) | 試劑(2) (%) |
|----------|-----------|-----------|
|----------|-----------|-----------|

---

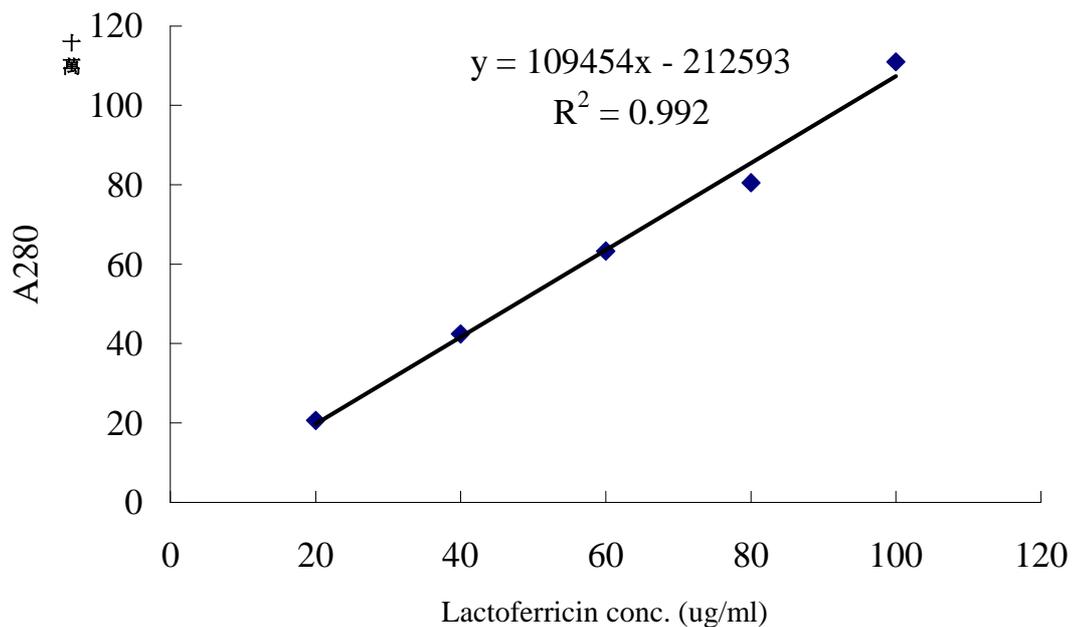
|    |    |    |
|----|----|----|
| 0  | 80 | 20 |
| 20 | 80 | 20 |
| 50 | 65 | 35 |

流 速：5 ml/min

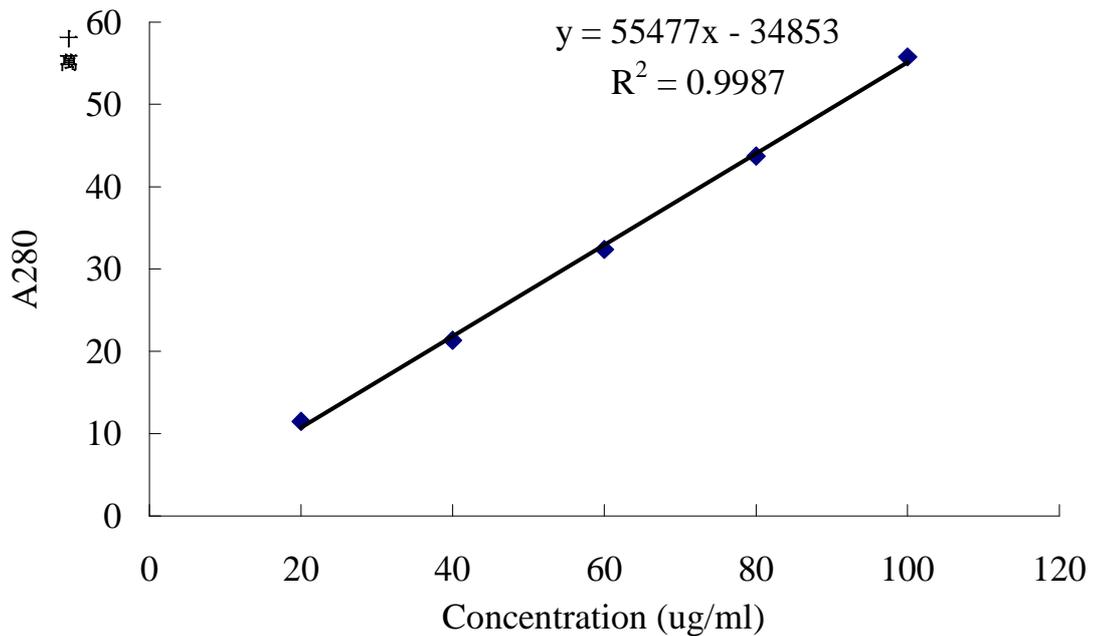
偵 測 器：280 nm

### 3. 抗菌胜肽之標準曲線

將收集純化的 peptide 1 及乳鐵蛋白素序列稀釋為濃度 100、80、60、40 及 20  $\mu\text{g/ml}$ ，利用步驟(1)的條件進行分析，將其吸光值與濃度作一線性方程式為標準曲線（圖十），用以計算樣品中之乳鐵蛋白素濃度。



(A)



(B)

圖十八、抗菌胜肽之標準曲線

Fig. 18. Standard curve of antibacterial peptides. (A) peptide 1 (B) lactoferricin

## 第二部分 牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉抗菌性及抗氧化性之探討

### 一、實驗材料

(一) 原料肉：豬後腿瘦肉 (ham) (購自台中市西區模範市場)。

(二) 食品添加物：牛乳鐵蛋白水解物 (bovine lactoferrin hydrolysate; bLFH) (製備方法見下方原料處理的第一部份)、乙烯二胺

四醋酸二鈉 (ethylenedinitrilo tetraacetic acid disodium salt dihydrate; EDTA · 2Na;  $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ ; Merck, Germany)。

(三) 包裝材料：發泡生鮮盤 (polystyrene foam tray, 19.0 cm × 12.5 cm; 泉軒企業有限公司，台中，台灣)、PE 膜 (泉軒企業有限公司，台中，台灣)。

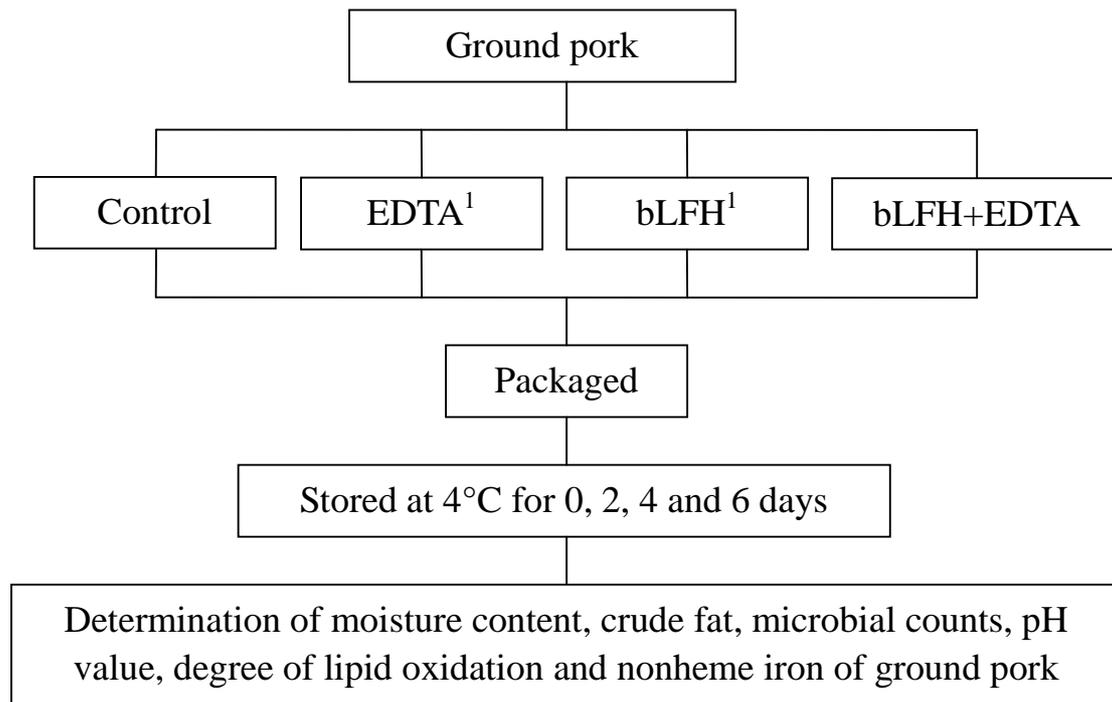
## 二、試驗設計

本實驗之試驗設計如圖十五所示。

## 三、原料處理

### (一) 牛乳鐵蛋白水解物之製備

依 Hoek *et al.* (1997) 的方法進行牛乳鐵蛋白水解物之製備。



<sup>1</sup>EDTA = 250 ppm

bLFH = 2 × MIC (minimal inhibitory concentration)

圖十九、豬後腿絞肉添加處理的試驗流程圖。

Fig. 19. The flow chart of experimental design for ground ham.

將牛乳鐵蛋白溶於去離子水中 (5% w/v)，再以 1 N 的鹽酸 (hydrochloric acid; HCl; 聯工化學廠股份有限公司，新竹，台灣) 調整溶液的 pH 值至 2.5。加入 3% 胃蛋白酶 (pepsin A; EC 3.4.23.1; gma, USA) 於 37°C 下反應 4 小時後 (E/S = 3%)，以 80°C 水浴 20 分鐘，終止酵素反應。將水解液以流水方式進行冷卻 (約 20°C) 後，利用 1 N 的氫氧化鈉 (sodium hydroxide; NaOH; 聯工化學廠股份有限公司，新竹，台灣) 調整溶液的 pH 值至 7.0。以冷凍離心機 (refrigerated centrifuge; himac SCR 20B, Hitachi, Tokyo, Japan) 於 4°C 下以 17,000 × g 離心 15 分鐘後，取其上清液進行冷凍乾燥，將凍乾後粉末狀之水解物凍存於 -20°C 下，備用。

## (二) 豬後腿絞肉之製備

自台中市西區模範市場購買溫體豬後腿瘦肉 (ham)，以快速 (30 分鐘內) 和低溫保藏 (約 4°C) 下運至東海大學品質管制研究室，將豬後腿瘦肉以去離子水清洗擦乾後，於 7°C 下冷藏 18-24 小時。試驗當天將豬後腿瘦肉之結締組織及可見脂肪去除後分切成小塊，以絞肉機 (TALLERES RAMON S.L., Vilassar de Dalt, Barcelona) 予以絞碎。先以 2.0 公分孔目之絞盤 (plate) 進行一次粗絞，再以 0.6 公分孔目之絞盤進行二次細絞，即為豬後腿絞肉

(ground ham)。將樣品稱重並逢機分成四組，第一組為控制組（原料肉中無添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA）；第二組為 EDTA 組，即添加 250 ppm 的 EDTA；第三組為 bLFH 組，即添加 2 倍最小抑菌濃度 (MIC) 的牛乳鐵蛋白水解物 (4 mg/g meat)；第四組為 bLFH+EDTA 組，即添加 2 倍最小抑菌濃度的牛乳鐵蛋白水解物 (4 mg/g meat) 及 250 ppm 的 EDTA。將添加物先溶於無菌去離子水中（水的用量為原料肉重之 1%），再加入樣品（控制組也添加等量的無菌去離子水），以攪拌機 (Hobart, Kitchen Aid model K45SS, Ohio, USA) 攪拌 5 分鐘（攪動速度：2，約 38 圈/10 秒）。攪拌後，各組稱重並置於發泡生鮮盤中，以 PE 膜包裝後，於 4°C 下低溫貯藏，並於 0、2、4、6 天取樣，進行以下分析項目。

#### 四、分析項目

##### (一) 水分含量 (moisture content) 測定

依 A.O.A.C (1991) 的方法進行水分含量測定。

稱取約 10 g 的絞碎樣品於事先烘乾且達恆重的鋁盤中，置入 100±2°C 的恆溫乾燥箱 (Risen, RUD-30L, Taipei, Taiwan) 乾燥 16-18 小時，以鑷子將鋁盤取出並置入玻璃乾燥器 (desiccator)

中，冷卻至室溫（約 30 分鐘）後稱重，反覆稱重達恆重為止。

水分含量的計算公式如下：

$$\text{水分 (\%)} = \frac{(W_1 + W_2) - W_3}{W_2} \times 100\%$$

$W_1$ ：鋁盤恆重重量 (g)

$W_2$ ：樣品重量 (g)

$W_3$ ：鋁盤及樣品乾燥至恆重時的總重量 (g)

## (二) 粗脂肪 (crude fat) 測定

依 A.O.A.C (1984) 的方法進行粗脂肪含量測定。

以稱量紙稱取 5 g 的絞碎樣品放入圓筒濾紙 (thimble) 中，將圓筒濾紙與含有 3-5 顆沸石 (boiling stone; 林純藥工業株式會社，大阪，日本) 的萃取杯 (extraction cup) 置入  $100 \pm 2^\circ\text{C}$  的恆溫乾燥箱 (Risen, RUD-30L, Taipei, Taiwan) 乾燥 1-2 小時，以鑷子將兩者取出並置入玻璃乾燥器 (desiccator) 中，冷卻至室溫（約 30 分鐘）後，將萃取杯稱重，並加入  $2/3$  容積的石油醚 (petroleum ether; 聯合化學股份有限公司，新竹，台灣)，以粗脂肪快速測定儀 (Tecator, Soxtec System HT6 Extraction Unit 1043 及 Service Unit 1046, HÖGANÄS, Sweden) 萃取樣品之粗脂肪，

將萃取後之萃取杯置於加熱板 (hot plate) 上乾燥至無味為止，再置入玻璃乾燥器中，冷卻 30 分鐘後稱重。

粗脂肪含量的計算公式如下：

$$\text{粗脂肪 (\%)} = \frac{W_3 - W_2}{W_1} \times 100\%$$

$W_1$ ：樣品重量 (g)

$W_2$ ：萃取杯 (含沸石) 的重量 (g)

$W_3$ ：萃取杯 (含沸石) 及樣品乾燥至恆重時的總重量 (g)

### (三) 脂肪氧化酸敗程度 (degree of lipid oxidation) 測定

依 Ockerman (1985) 的方法進行脂肪氧化酸敗程度測定。

TBARS 值 (thiobarbituric acid-reactive substance value) 為脂質氧化酸敗程度的指標，主要是測定油脂中含有三個以上雙鍵的不飽和脂肪酸，經氧化後所產生的二級氧化產物—丙二醛 (malonaldehyde; MDA) 的量。氧化酸敗情形愈嚴重，產生的丙二醛則愈多，丙二醛與硫巴比妥酸試劑 (TBA reagent) 中的硫巴比妥酸 (2-thiobarbituric acid; TBA) 反應生成之紅色物質也愈多，以分光光度計測定 538 nm 下的吸光值就會愈高。

## 1. 反應試劑之配製

將 1.442 g 的硫巴比妥酸 (2-thiobarbituric acid; TBA; Sigma, USA) 溶於 500 mL 90% 冰醋酸 (glacial acetic acid; 島久藥品株式會社，大阪，日本) 中，並置於棕色瓶中備用，此為硫巴比妥酸試劑 (TBA reagent)。

## 2. 測定步驟

秤取 10 g 絞碎樣品於均質瓶中，加入 50 mL 50°C 的蒸餾水，以均質機 (Osterizer, Mexico) 均質 2 分鐘後，將樣品均質液倒入克氏燒瓶 (PYREX<sup>®</sup> NO. 5420, Raleigh, North Carolina, USA) 中。以 47.5 mL 50°C 的蒸餾水沖洗均質瓶後，再於克氏燒瓶中加入 2 mL 4 N 的鹽酸 (hydrochloric acid; HCl; 聯工化學廠股份有限公司，新竹，台灣)、數滴抗泡劑 (antifoam A emulsion; Sigma, USA) 和沸石 (boiling stone; 林純藥工業株式會社，大阪，日本) 進行蒸餾，並收集 50 mL 的蒸餾液。取 5 mL 的蒸餾液 (空白組以 5 mL 的蒸餾水取代)，加入 5 mL 的硫巴比妥酸試劑後，於沸水浴中加熱 35 分鐘，再以流水冷卻 10 分鐘，立即以分光光度計 (spectrophotometer; Spectronic genesys 5, Milton roy company, New York, USA) 測定 538 nm 下的吸光值。

TBARS 值的計算公式如下：

$$\text{TBARS value (mg malonaldehyde/Kg of meat)} = \text{O.D.} \times 7.8$$

7.8：由 0-10  $\mu\text{M}$  TMP (1,1,3,3-tetramethoxypropane) 製作之  
TMP 標準曲線所得之常數 K 值。

#### (四) 酸鹼值 (pH value) 測定

依 Ockerman (1985) 的方法進行酸鹼值測定。

秤取樣品 10 g，加入 100 mL 的蒸餾水，以均質機 (Osterizer, Mexico) 均質 1 分鐘。將酸鹼度計 (Laboratory pH Meter; inoLab pH Level 1, WTW, Germany) 先以不同酸鹼值 (pH 4 和 pH 7) 之校正液 (WTW 108 708, Weilheim, Germany) 進行校正，再將玻璃電極 (glass electrode; InLab 427, Mettler Toledo, USA) 插入樣品均質液中檢測，直到酸鹼值不再變化為止。

#### (五) 微生物測定 (microbial analysis)

##### 1. 總生菌數 (total plate count; TPC)

依 CNS (1991) 的方法進行總生菌數測定。

將樣品絞碎後秤取 10 g，放入已滅菌之均質瓶中，加入 90

mL 已滅菌之 0.1% peptone water (Difco™, Sparks, USA) 後，以均質機 (Osterizer, Mexico) 均質 1 分鐘。利用已滅菌之 0.1% peptone water 將樣品稀釋成適當倍數後，取 1 mL 的樣品稀釋液於無菌培養皿 (petri dish) 中，以傾倒法 (pour plate method) 倒入 12-15 mL (約 45°C) 的無菌 plate count agar (PCA) (Difco™, Sparks, USA)。待凝固後，將培養皿倒置培養於 35-37°C 恆溫培養箱 (光勝儀器製作所，台北，台灣) 中 48±2 小時。選取菌落數在 25-250 間之培養皿，並計算其菌落數 (CFU/g)。

## 2. 乳酸菌數 (lactic acid bacterial counts)

依 Lacroix (2002) 的方法進行乳酸菌數測定。

吸取 1 mL 的樣品稀釋液，以傾倒法 (pour plate method) 倒入 12-15 mL (約 45°C) 的無菌 Lactobacilli MRS agar (Difco™, Sparks, USA)。待凝固後，將培養皿倒置培養於 35-37°C 恆溫培養箱 (光勝儀器製作所，台北，台灣) 中 48±2 小時。選取菌落數在 25-250 間之培養皿，並計算其菌落數 (CFU/g)。

## 3. 大腸桿菌群 (coliforms)

依 Hall *et al.* (1967) 的方法進行大腸桿菌群測定。

吸取 1 mL 的樣品稀釋液，以傾倒法 (pour plate method) 倒入 12-15 mL (約 45°C) 的無菌 violet red bile agar (VRB agar) (Merck, Germany)。待凝固後，再倒入 3-5 mL (約 45°C) 相同的培養基，形成多層培養基。待凝固後，將培養皿倒置培養於 35-37°C 恆溫培養箱 (光勝儀器製作所，台北，台灣) 中 24 小時。選取菌落數在 25-250 間之培養皿，並計算其菌落數 (CFU/g)。

#### (六) 非血基質鐵 (nonheme iron)

依 Rhee and Zuprin (1987) 的方法進行非血基質鐵測定。

##### 1. 反應試劑之配製

##### (1) 0.39% 亞硝酸鈉 (sodium nitrite; $\text{NaNO}_2$ ) (需當日現配)

稱取 0.39 g 的亞硝酸鈉 (sodium nitrite;  $\text{NaNO}_2$ ; Sigma, USA)，以去離子水定量至 100 mL。由於只加入 0.2 mL 此溶液至酸混合溶液 (acid mixture) 中，且樣品重為 5 g，故亞硝酸鈉在全部溶液中為 156 ppm。使用亞硝酸鈉的目的為穩定卟啉環 (porphyrin ring)，避免實驗過程中的酸與溫度造成血基質鐵 (heme-associated iron) 斷裂成非血基質鐵 (nonheme iron) 而造成非血基質鐵的高估 (overestimate)。

(2) 酸混合溶液 (acid mixture; HCl-TCA solution)

將 6 N 的鹽酸 (hydrochloric acid; HCl; 聯工化學廠股份有限公司, 新竹, 台灣) 和 40% 的三氯醋酸 (trichloroacetic acid; TCA; Sigma, USA) 以等體積混合。三氯醋酸為一種蛋白質沉澱劑, 可以使肉中的血基質蛋白 (hemeprotein) 沉澱。

(3) 深啡啉雙磺酸酯試劑 (bathophenanthroline disulfonate reagent)

取 0.162 g 的 bathophenanthroline disulfonic acid (Sigma, USA), 溶於 100 mL 的去離子水中, 加入 2 mL 的硫乙醇酸 (thioglycolic acid; Merck, Germany), 將配好的試劑貯存於褐色瓶中。因為加熱樣品時會促進硫化基生成, 使  $\text{Fe}^{3+}$  還原成  $\text{Fe}^{2+}$ , 此亞鐵離子會與深啡啉雙磺酸酯試劑反應, 生成的複合物在 540 nm 下有吸收峰。

(4) 飽和醋酸鈉溶液 (saturated sodium acetate solution)

取 500 mL 去離子水至燒杯中加熱攪拌, 再加入無水醋酸鈉 (sodium acetate anhydrous; J. T. Baker, USA) 到過飽和狀態, 若有白色醋酸鈉沉澱出現則停止添加, 冷卻至室溫後, 劇烈攪拌溶液使之析出白色、針狀的醋酸鈉結晶, 待結晶完全析出並沉澱, 即

得飽和醋酸鈉溶液。

(5) 顏色試劑 A (color reagent A) (需當日現配)

配製去離子水：飽和醋酸鈉溶液：深啡琳雙磺酸酯試劑= 20：20：1 的溶液。

(6) 顏色試劑 B (color reagent B) (需當日現配)

配製去離子水：飽和醋酸鈉溶液= 21：20 的溶液。

2. 標準檢量曲線之製作

分別吸取 0、0.0125、0.025、0.05、0.075 及 0.1 mL 之鐵標準溶液 (iron standard solution, 1000 mg Fe<sup>3+</sup>/L; Merck, Germany) 並以酸混合溶液 (acid mixture) 定量至 25 mL，使稀釋成濃度為 0、0.5、1、2、3 及 4 mg Fe<sup>3+</sup>/L 的 iron standard solution-acid mixture。

各吸取 1 mL 的 iron standard solution-acid mixture 至離心管中，加入 5 mL 的顏色試劑 A，震盪混合均勻後，以冷凍離心機 (refrigerated centrifuge; himac SCR 20B, Hitachi, Tokyo, Japan) 於 4°C 下以 3500 × g 離心 10 分鐘，以分光光度計 (spectrophotometer; Spectronic genesys 5, Milton roy company, New York, USA) 測定

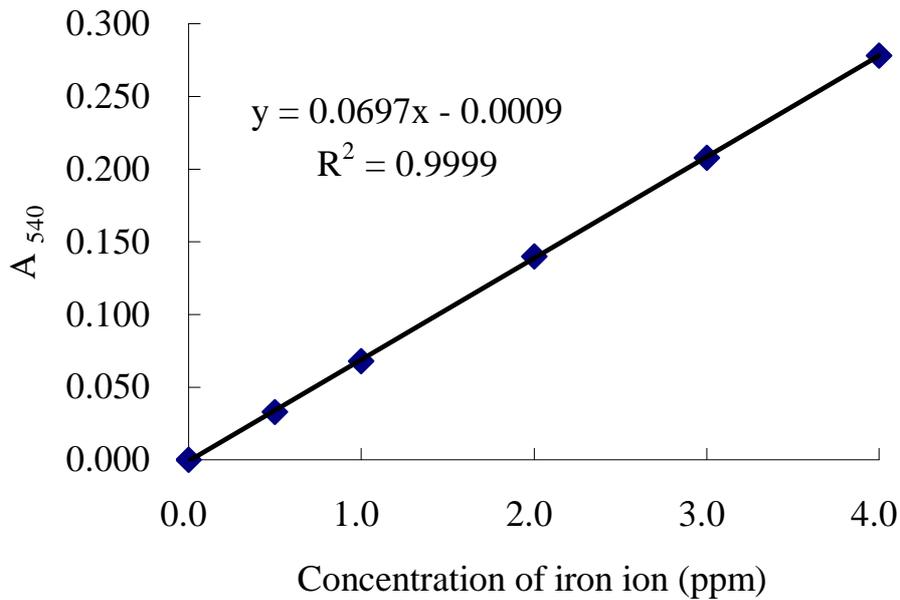
540 nm 下的吸光值，以 1 mL 的酸混合溶液取代標準溶液作為空白對照組，製作標準檢量曲線，結果如圖十六所示。

### 3. 測定步驟

秤取 5 g 絞碎豬肉於試管中，加入 0.2 mL 的 0.39% 亞硝酸鈉和 15 mL 的酸混合溶液。蓋上塑膠蓋，於 65°C 恆溫震盪水浴器 (shaking bath; RCB-411, Kansin Instruments Co., Ltd., Taiwan) 中震盪 (75 rpm) 反應 20 小時後，取出並以流水方式冷卻 (約 20°C)。吸取 1 mL 上層液 (incubated liquid phase) 至離心管中，加入 5 mL 的顏色試劑 A (此時呈淡粉紅色)，震盪混合均勻後，以冷凍離心機於 4°C 下以 3500 × g 離心 10 分鐘，以分光光度計測定 540 nm 下的吸光值 (A 值)。為扣除因加熱所造成的褐色干擾，另取 1 mL 上層液 (incubated liquid phase) 至離心管中，加入 5 mL 的顏色試劑 B (此時呈淡黃色)，震盪混合均勻後，以冷凍離心機於 4°C 下以 3500 × g 離心 10 分鐘，以分光光度計測定 540 nm 下的吸光值 (B 值)。以 1 mL 的酸混合溶液取代標準溶液作為空白對照組。將 A 值減掉 B 值後所得的 C 值，利用標準檢量曲線換算上層液中的含鐵量，並以下列公式計算出各組絞碎豬肉中的非血基質鐵含量。

非血基質鐵含量的計算公式如下：

$$\text{Nonheme iron content } (\mu\text{g nonheme iron/g of meat}) = \frac{\text{Fe conc. of liquid } (\mu\text{g/mL}) \times (15 \text{ mL} + \text{moisture content of 5 g meat})}{5 \text{ (g)}}$$



圖二十、非血基質鐵之標準檢量曲線。

Fig. 20. Standard curve for nonheme iron content.

## 五、統計分析 (statistical analysis)

本試驗採完全逢機設計 (completely randomized design; CRD)，處理間採複因子試驗 (factorial experiment)。測定項目所得之數據利用 statistical analysis system (SAS, 2002) 統計套裝軟體進行分析，以一般

線性模式程式 (GLM procedure) 進行不同處理間之差異性及相關性測定，並以最小平方平均值 (least-square mean) 測驗法比較各處理組平均值之間差異顯著性。

### 第三部分 牛乳鐵蛋白水解物對貢丸抗菌性之探討

#### 一、實驗材料

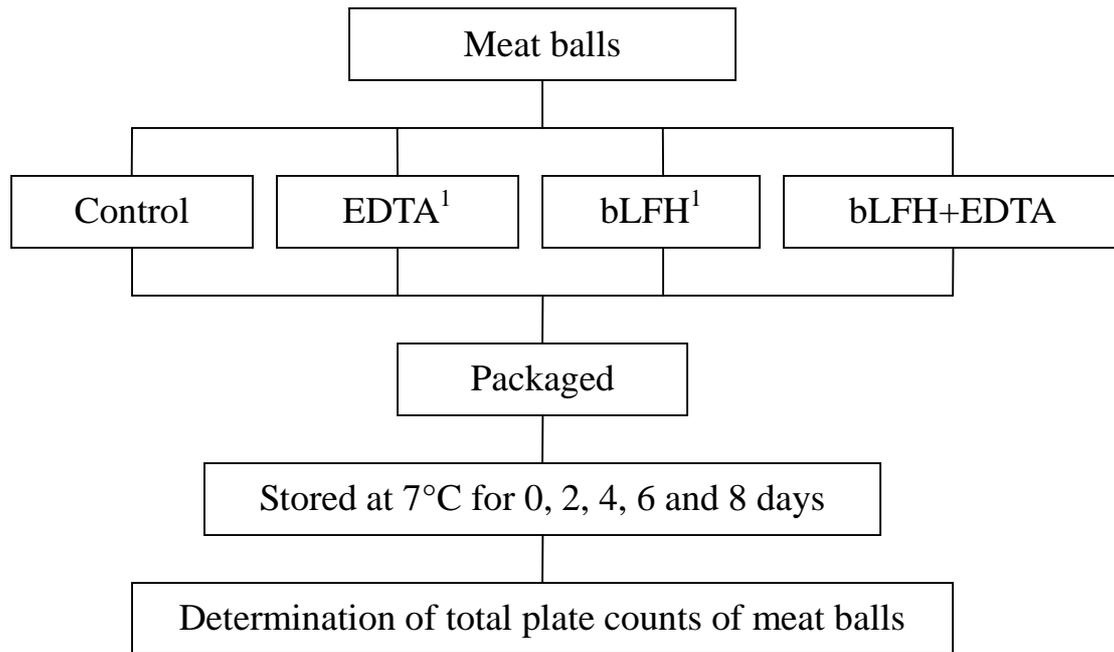
(一) 原料肉：豬後腿瘦肉 (ham) 與背脂 (back fat) (購自台中市西區模範市場)。

(二) 食品添加物：牛乳鐵蛋白水解物 (bovine lactoferrin hydrolysate; bLFH) (製備方法見後面原料處理的第一部分)、乙烯二胺四醋酸二鈉 (ethylenedinitrilo tetraacetic acid disodium salt dihydrate; EDTA · 2Na;  $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ ; Merck, Germany)、食鹽 (sodium chloride; NaCl; 臺鹽實業股份有限公司，苗栗，台灣)、多磷酸鈉 (sodium triphosphate; 振芳股份有限公司，台北，台灣)、砂糖 (sugar; 臺陽食品，彰化，台灣)、味精 (L-麩酸鈉) (monosodium L-glutamate; M.S.G; 味全食品工業股份有限公司，台中，台灣)。

(三) 包裝材料：發泡生鮮盤 (polystyrene foam tray, 19.0 cm × 12.5 cm; 泉軒企業有限公司，台中，台灣)、PE膜 (泉軒企業有限公司，台中，台灣)。

#### 二、試驗設計

本實驗之試驗設計如圖十七所示。



<sup>1</sup>EDTA = 250 ppm

bLFH = 2 × MIC (minimal inhibitory concentration)

圖二十一、貢丸處理試驗流程圖。

Fig. 21. The flow chart of experimental design for meat balls.

表九、 貢丸之配方。

Table 9. The formulation of meat balls.

| Ingredients                 | Content |
|-----------------------------|---------|
| Raw meat                    | 100.0%  |
| Ham                         | 75.0%   |
| Back fat                    | 25.0%   |
| Sodium chloride             | 1.8%    |
| Sodium triphosphate         | 0.3%    |
| Ice sterile deionized water | 2.0%    |
| Sugar                       | 3.0%    |
| Monosodium L-glutamate      | 0.3%    |

### 三、原料處理

#### (一) 牛乳鐵蛋白水解物之製備

依 Hoek *et al.* (1997) 的方法進行牛乳鐵蛋白水解物之製備。

將牛乳鐵蛋白溶於去離子水中 (5% w/v)，再以 1 N 的鹽酸 (hydrochloric acid; HCl; 聯工化學廠股份有限公司，新竹，台灣) 調整溶液的 pH 值至 2.5。加入 3% 胃蛋白酶 (pepsin A; EC 3.4.23.1; gma, USA) 於 37°C 下反應 4 小時後 (E/S = 3%)，以 80°C 水浴 20 分鐘，終止酵素反應。將水解液以流水方式進行冷卻 (約 20°C) 後，利用 1 N 的氫氧化鈉 (sodium hydroxide; NaOH; 聯工化學廠股份有限公司，新竹，台灣) 調整溶液的 pH 值至 7.0。以冷凍離心機 (refrigerated centrifuge; himac SCR 20B, Hitachi, Tokyo, Japan) 於 4°C 下以 17,000 × g 離心 15 分鐘後，取其上清液進行冷凍乾燥，將凍乾後粉末狀之水解物凍存於 -20°C 下，備用。

#### (二) 貢丸之製備

自台中市西區模範市場購買溫體豬後腿瘦肉 (ham) 及背脂 (back fat)，以快速 (30 分鐘內) 和低溫保藏 (約 4°C) 下運至東海大學品質管制研究室，將豬後腿瘦肉及背脂以去離子水清洗擦

乾後，於 7°C 下冷藏 18-24 小時。試驗共有四組處理，第一組為控制組（原料肉中無添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA）；第二組為 EDTA 組，即添加 250 ppm 的 EDTA；第三組為 bLFH 組，即添加 2 倍最小抑菌濃度 (MIC) 的牛乳鐵蛋白水解物 (4 mg/g meat)；第四組為 bLFH+EDTA 組，即添加 2 倍最小抑菌濃度的牛乳鐵蛋白水解物 (4 mg/g meat) 及 250 ppm 的 EDTA。將添加物先溶於無菌去離子水中（水的用量為原料肉重之 2%），並冷藏於 2°C 下備用，取代貢丸製備時需添加的冰水（控制組也添加等量的無菌去離子水）。試驗當天先將豬後腿瘦肉之結締組織及可見脂肪去除，再與背脂一同分別切成小塊（約 2-3 cm<sup>3</sup>）並加以冷凍（-5°C，2 小時）。將冷凍後的豬後腿瘦肉置於細切機 (Stephan vertical vacuum cutter; Model UM 5 Universal, Stephan Machinery Co., Hameln, Germany) 中細切 1 分鐘。細切後加入多磷酸鈉及食鹽，並細切 1 分鐘，以萃取鹽溶性蛋白。切成極富黏性之肉漿後，先加入冰的無菌去離子水並細切 5 秒，再加入砂糖、味精及背脂，繼續切成乳漿狀 (45 秒)。成型於 40-50°C 的蒸餾水中，待全部成型完畢，再將水溫加熱到 80°C 左右，於 80°C 下水煮 15 分鐘後，逢機選取 6 顆貢丸以中心溫度測定儀 (Yokogawa, Tokyo, Japan) 測定其中心溫度（約為 78°C）。將各組

貢丸撈起並以流水（自來水）冷卻 30 分鐘，待其冷卻後，將各組貢丸撈起稱重並置於發泡生鮮盤中，以 PE 膜包裝後，於 7°C 下低溫貯藏，並於 0、2、4、6、8 天取樣，進行總生菌數 (total plate count; TPC) 的測定。各組配方如表九所示。

#### 四、總生菌數測定

依 CNS (1991) 的方法進行總生菌數測定。

將樣品切碎後稱取 10 g，放入已滅菌之均質瓶中，加入 90 mL 已滅菌之 0.1% peptone water 後，以均質機均質 1 分鐘。利用已滅菌之 0.1% peptone water 將樣品稀釋成適當倍數後，取 1 mL 的樣品稀釋液於無菌培養皿中，以傾倒法 (pour plate method) 倒入 12-15 mL (約 45°C) 的無菌 plate count agar (PCA)。待凝固後，將培養皿倒置培養於 35-37°C 恆溫培養箱中 48±2 小時。選取菌落數在 25-250 間之培養皿，並計算其菌落數 (CFU/g)。

#### 五、統計分析 (statistical analysis)

本試驗採完全逢機設計 (completely randomized design; CRD)，處理間採複因子試驗 (factorial experiment)。測定項目所得之數據利用 statistical analysis system (SAS, 2002) 統計套裝軟體進行分析，以一般

線性模式程式 (GLM procedure) 進行不同處理間之差異性及相關性測定，並以最小平方平均值 (least-square mean) 測驗法比較各處理組平均值之間差異顯著性。

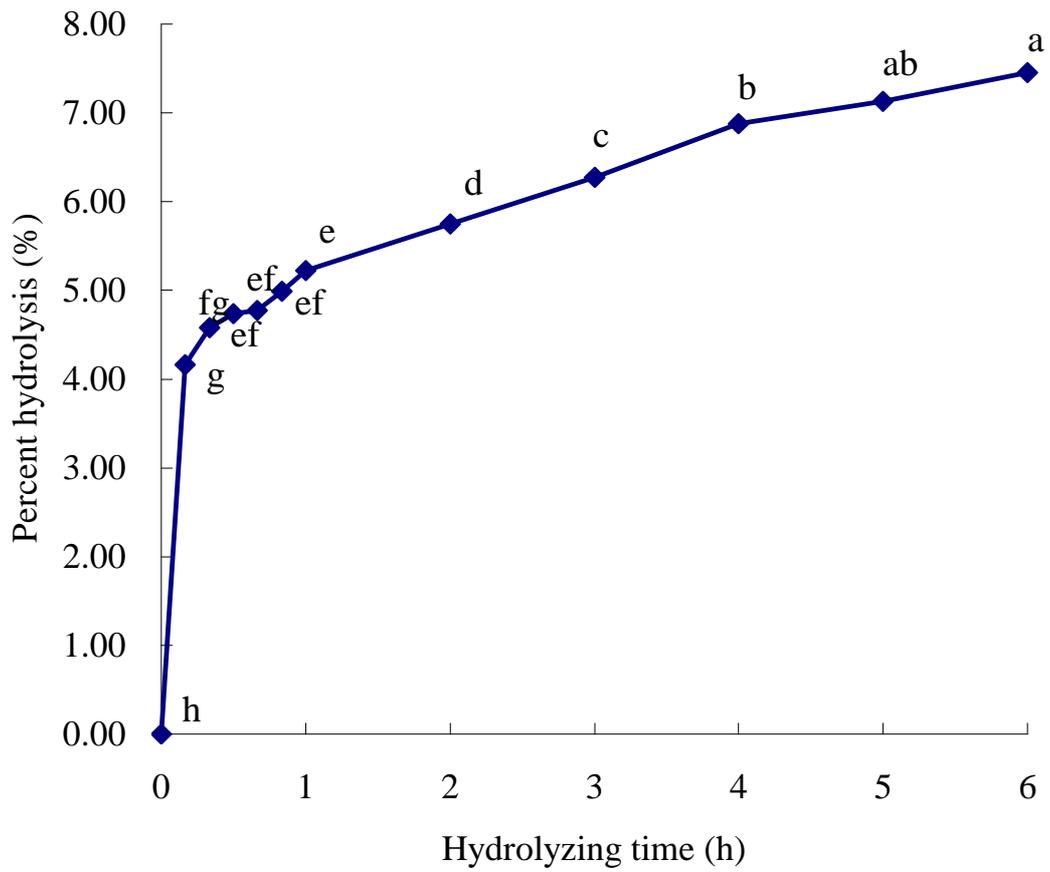
# 肆、結果與討論

## 第一部分 牛乳鐵蛋白水解液的製備與抗菌性之探討

### 一、牛乳鐵蛋白的水解情形

*o*-Phthaldialdehyde (OPA) OPA分光光度法在分析蛋白質水解測試上的應用，是測量蛋白質中 $\alpha$ -胺基的釋出量。OPA及 $\beta$ -mercaptoethanol會與一級胺(primary amines)反應，並生成在340 nm下有強烈吸光性之產物(1-alkylthio-2-alkylisoindole)。OPA試劑中所含的1% SDS不只是用來將受質(蛋白質)變性以確保反應能完全進行，以得到我們想要的胺基，而且可以用來中止酵素水解反應。因此，利用OPA分光光度法監控蛋白質水解情形，為一種快速、方便且敏感的測定方法。

圖十八為使用*o*-Phthaldialdehyde (OPA) 分光光度法測定牛乳鐵蛋白的水解程度。結果顯示，隨著水解時間的增加，牛乳鐵蛋白的水解率也跟著上升。Tomita *et al.* (1991) 以胃蛋白酶分別對牛乳鐵蛋白及人乳鐵蛋白進行4小時的水解(37°C)，並從兩水解產物中分離出更具抗微生物活性的胜肽。接著，Bellamy *et al.* (1992) 將造成乳鐵蛋白水解物具有抗微生物活性的胜肽分離出來，經純化後進行定序，分別命名為牛乳鐵蛋白素與人乳鐵蛋白素。本實驗所使用的水解條件與Tomita *et al.* (1991) 及Bellamy *et al.* (1992) 相同，僅增加於水解過程中的採樣時間點。圖二十二為使用*o*-Phthaldialdehyde (OPA) 分光光度法測定牛乳鐵蛋白水解程度的結果。實驗結果發現，反應進行10分鐘，牛乳鐵蛋白便有明顯的水解現象，水解率達4.16%。反應進行30分鐘後，水解率明顯上升至4.74%。隨著反應時間的增加，所測得的水解率也顯著上升，本實驗測得反應2、3、4、5、6小時後的水解率分別為5.57%、6.27%、6.88%、7.13%與7.46%。



圖二十二、使用 *o*-Phthaldialdehyde (OPA) 分光光度法測定牛乳鐵蛋白的水解程度。

Fig. 22. Hydrolysis of bovine lactoferrin is determined by using the *o*-phthaldialdehyde spectrophotometric assay.

## 二、牛乳鐵蛋白及其水解液的抗菌表現

乳鐵蛋白已經被證實能抑制多種革蘭氏陰性菌（如 *Escherichia coli*、*Salmonella enteritidis*、*Pseudomonas aeruginosa*）、革蘭氏陽性菌（如 *Staphylococcus aureus*、*Listeria monocytogenes*、*Bacillus subtilis*）、真菌（如 *Candida albicans*、*Cryptococcus uniguttulatus*）及好氧菌（aerobes）、厭氧菌（anaerobes）與酵母菌（yeast）（Weinberg, 1984）。又 Tomita *et al.* (1991b) 指出牛乳鐵蛋白之胃蛋白酶水解物能廣泛的對革蘭氏陽性菌與革蘭氏陰性菌產生抗菌效果，且其抗菌能力也比乳鐵蛋白高出9-25倍。故本次研究分別挑選金黃葡萄球菌（*Staphylococcus aureus* ATCC 9144）及綠膿桿菌（*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14207）作為革蘭式陽性菌及陰性菌的代表測試菌株，且由於在過去的牛乳鐵蛋白水解物抗菌表現之文獻中，皆使用反應4小時後所得之水解產物進行抗菌試驗，為能將本次實驗結果與文獻做比較，故本實驗採用反應4小時的水解物來進行最小抑菌濃度（minimal inhibitory concentration; MIC）試驗。

### （一）金黃葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）

受金黃葡萄球菌污染的食品種類繁多，包括乾酪（Westhoff *et al.*, 1973; Ahmed *et al.*, 1983）、中濕性肉品（Plitman *et al.*, 1973; Kotzekidou *et al.*, 1991）、家禽肉（Raccach *et al.*, 1979）、魚（特別是甲殼綱動物）（Baird *et al.*, 1995）、香腸（Petchsing *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1977）及烘焙製品（特別是軟質奶油冰淇淋或奶油充填物）（Baird *et al.*, 1995）等，因此，有學者指出動物性食品及乳製品是此菌最主要的感染源（Santos *et al.*, 1981）。

表十為牛乳鐵蛋白及水解 4 小時之牛乳鐵蛋白水解液對金黃葡萄球菌與假單胞桿菌的抗菌表現。實驗結果發現，完整的牛乳鐵蛋白分子對金黃葡萄球菌的 MIC 為 2.0 mg/mL。乳鐵蛋白的抗菌表現一部分是來自於螯合環境中的游離鐵，由於鐵是微生物生長的必要因子，故細菌會因缺鐵而無法生長 (Bullen *et al.*, 1972; Otto *et al.*, 1992)。Murdock *et al.* (2002) 以 *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 及 ATCC 10832 為測試菌株，並以 peptone-yeast-glucose (PYG) broth 為培養基進行牛乳鐵蛋白的抗菌測試，結果發現完整的牛乳鐵蛋白分子對於該二株金黃葡萄球菌的 MIC 為 8.0 mg/mL，比本次實驗所得之 MIC 值高出 4 倍，可能原因為本次實驗所使用的培養基為 nutrient broth，與文獻有所不同所致，且使用的測試菌株也不相同。Murdock *et al.* (2002) 亦指出會造成抗菌測試結果不同的可能原因為所使用的菌種不同、養菌的方法不同、純化牛乳鐵蛋白及其水解物的方法不同。

經水解 4 小時後，所得之水解物對金黃葡萄球菌的 MIC 為 0.25 mg/mL。Dionysius *et al.* (1997) 從胃蛋白酶處理所得之牛乳鐵蛋白水解物中，分離出三種抗菌胜肽，分別命名為 peptide I、peptide II 及 peptide III (見圖五)。三種胜肽皆帶正電且都來自牛乳鐵蛋白的 N 端，其中 peptide I 的 C 端處只比 Bellamy *et al.* (1992) 發現的牛乳鐵蛋白素多了一個丙胺酸 (alanine)。Vorland *et al.* (1999) 則指出抗菌胜肽鏈上帶正電的胺基酸殘基會與菌膜上帶負電的位置發生反應；其次，利用疏水性作用力，使 W (Trp) 能更進接近脂質 A (lipid A)，如此，抗菌胜肽就能更進一步的穿透外膜，造成菌體的外膜結構的瓦解。Murdock *et al.* (2002) 以 *S. aureus* ATCC 13565 及 ATCC 10832 為測試菌株，並以 PYG broth 為培養基進行牛乳鐵蛋白水解物的抗菌測試，結果發現水解物對於該二株金黃葡萄球菌的 MIC 為 4.0 mg/mL，比本

表十、牛乳鐵蛋白及水解4小時之牛乳鐵蛋白水解液對金黃葡萄球菌與綠膿桿菌的抗菌表現。

Table 10. Antimicrobial activity of bovine lactoferrin (bLF) and bovine lactoferrin hydrolysate (bLFH) hydrolyzed for 4 hours towards *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14207.

| Bacteria                        | MIC <sup>1</sup> (mg/mL) |            |
|---------------------------------|--------------------------|------------|
|                                 | bLF                      | bLFH (4 h) |
| <i>S. aureus</i> ATCC 9144      | 2.0                      | 0.25       |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 14207 | > 32.0                   | 2.0        |

<sup>1</sup>MIC (minimal inhibitory concentration) is the lowest concentration of peptide or protein that gave no increase in absorbance at 620 nm following incubation. bLF (unhydrolyzed) was assayed at concentration of 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 and 32.0 mg/mL. bLFH (4 h) was assayed at 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg/mL. The MIC values indicated were observed in three experiments.

次實驗所得之 MIC 值高出 16 倍，可能原因為本次實驗所使用的培養基為 nutrient broth，與文獻有所不同所致。

實驗結果顯示，牛乳鐵蛋白經水解後的抗菌表現提高了 8 倍，Murdock *et al.* (2002) 也有類似的結果。Tomita *et al.* (1991b) 亦指出牛乳鐵蛋白之胃蛋白酶水解物的抗菌能力比乳鐵蛋白高。

## (二) 綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)

表十為牛乳鐵蛋白及水解 4 小時之牛乳鐵蛋白水解液對金黃葡萄球菌與綠膿桿菌的抗菌表現。實驗結果發現，完整的牛乳鐵蛋白分子對假單胞桿菌的 MIC 大於 32.0 mg/mL。乳鐵蛋白能螯合環境中的游離鐵，使細菌因缺鐵而無法生長 (Bullen *et al.*, 1972; Otto *et al.*, 1992)，此外，乳鐵蛋白也會直接與革蘭氏陰性菌外膜作用，造成脂多醣體 (lipopolysaccharides; LPS) 的釋出 (Ellison *et al.*, 1988)。於綠膿桿菌培養期間發現，培養液呈現黏濁狀態，且培養液的表面有一層厚厚的黏膜，推測綠膿桿菌可能是透過分泌多醣黏液來限制牛乳鐵蛋白的抗菌表現，以至於在本實驗中，牛乳鐵蛋白對 *P. aeruginosa* ATCC 14207 這株菌無抗菌效果。Tomita *et al.* (1991) 以 *P. aeruginosa* MMI-603 為測試菌株，並以 1% peptone 為培養基進行牛乳鐵蛋白的抗菌測試，結果發現完整的牛乳鐵蛋白分子對於該株綠膿桿菌的 MIC 大於 8.0 mg/mL (該試驗的最高測試濃度)。儘管本實驗所使用的培養基為 BHI broth，與文獻有所不同，且所使用的測試菌株也不同，但是實驗結果皆發現綠膿桿菌對於牛乳鐵蛋白分子有相當的耐受性。

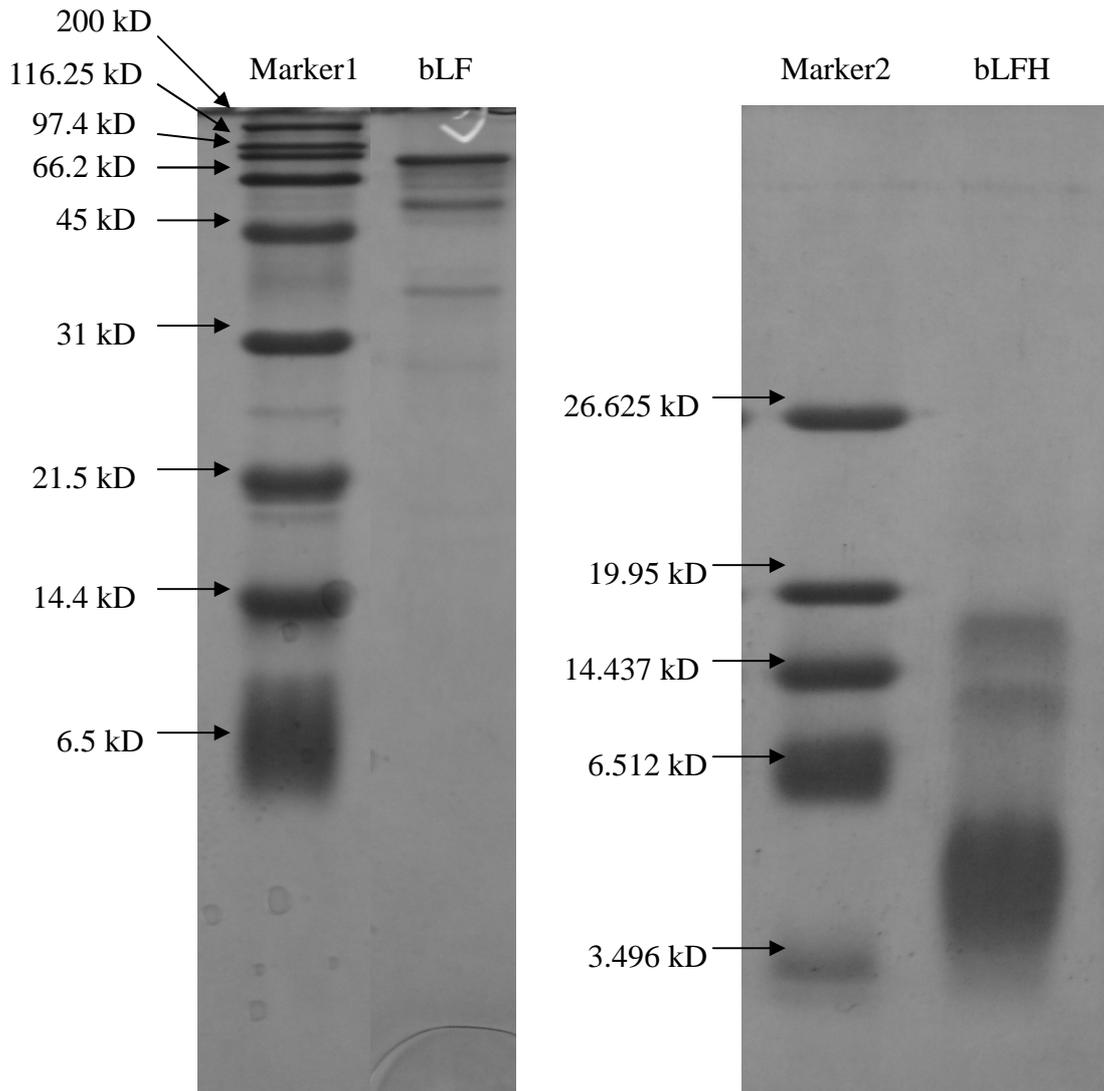
經水解 4 小時後，所得之水解物對綠膿桿菌的 MIC 為 2.0 mg/mL。Dionysius *et al.* (1997) 從胃蛋白酶處理所得之牛乳鐵蛋白水

解物中，分離出陽離子抗菌肽，其中含有牛乳鐵蛋白素。Van der Kraan *et al.* (2004) 也證實牛乳鐵蛋白素比完整的牛乳鐵蛋白分子具有較強的抗菌表現。Tomita *et al.* (1991b) 亦指出牛乳鐵蛋白之胃蛋白酶水解物的抗菌能力比乳鐵蛋白高。

### 三、牛乳鐵蛋白及其水解液的蛋白質電泳分析

圖二十七為牛乳鐵蛋白及水解 4 小時之牛乳鐵蛋白水解液電泳分析之影響。本實驗將反應 0 小時之牛乳鐵蛋白定義如下：將已調整 pH 至 2.5 之 5% (w/v) 牛乳鐵蛋白溶液升溫至 37°C 後取樣，以 80°C 水浴 20 分鐘後，再行流水冷卻，調整 pH 至 7.0 後，於 4°C 下以 17,000 × g 離心 15 分鐘，所得上清液即為反應 0 小時之牛乳鐵蛋白溶液。將該溶液訂好濃度後，進行蛋白質電泳，結果如圖二十七所示。實驗結果發現，牛乳鐵蛋白分子除了在~80 kD 處有明顯的色帶 (band) 外，在 55.6 kD 處及 38 kD 處也各有一個色帶，該二色帶應是由於牛乳鐵蛋白經過部分酸水解所產生。

實驗結果發現，反應 4 小時後所得之水解物主要是分子量在 3.496 kD-6.512 kD 之間的肽，且會在 17.5 kD 及 12.4 kD 處出現兩個副色帶。Murdock *et al.* (2002) 以相同條件對牛乳鐵蛋白進行水解，亦將所得水解物進行蛋白質電泳，所得結果發現牛乳鐵蛋白經胃蛋白酶處理後，會產生一條 25 kD 的肽，且大多數肽的分子量都在 10 kD 以下，其中在 3.8 kD 以下有一色帶。本實驗與 Murdock *et al.* (2002) 的結果相似，水解物經蛋白質電泳分析後，同樣出現三個色帶，然而，在分子量上有些許出入，可能原因為本次實驗所使用的胃蛋白酶純度較低所致。Tomita *et al.* (1991) 亦指出用豬的胃蛋白酶在 pH 2.5、37°C 下，對牛乳鐵蛋白切割 4 個小時，所得水解物的分子量皆低於 6 kD。



圖二十三、牛乳鐵蛋白及水解 4 小時之牛乳鐵蛋白水解液電泳分析之影響。

Fig. 23. SDS-PAGE electrophoresis of bovine lactoferrin (bLF) and bovine lactoferrin hydrolysate (bLFH) hydrolyzed for 4 hours.

#### 四、乳鐵蛋白水解液之特性

乳鐵蛋白經由實驗一的步驟進行水解後，可得到水解率為之乳鐵蛋白水解液，且經由標準曲線計算後，得到乳鐵蛋白水解液為 pH 7.0 濃度 8.1 mg/ml 之多胜肽水溶液。

#### 五、乳鐵蛋白水解液之分析

##### (一) 陽離子樹脂純化

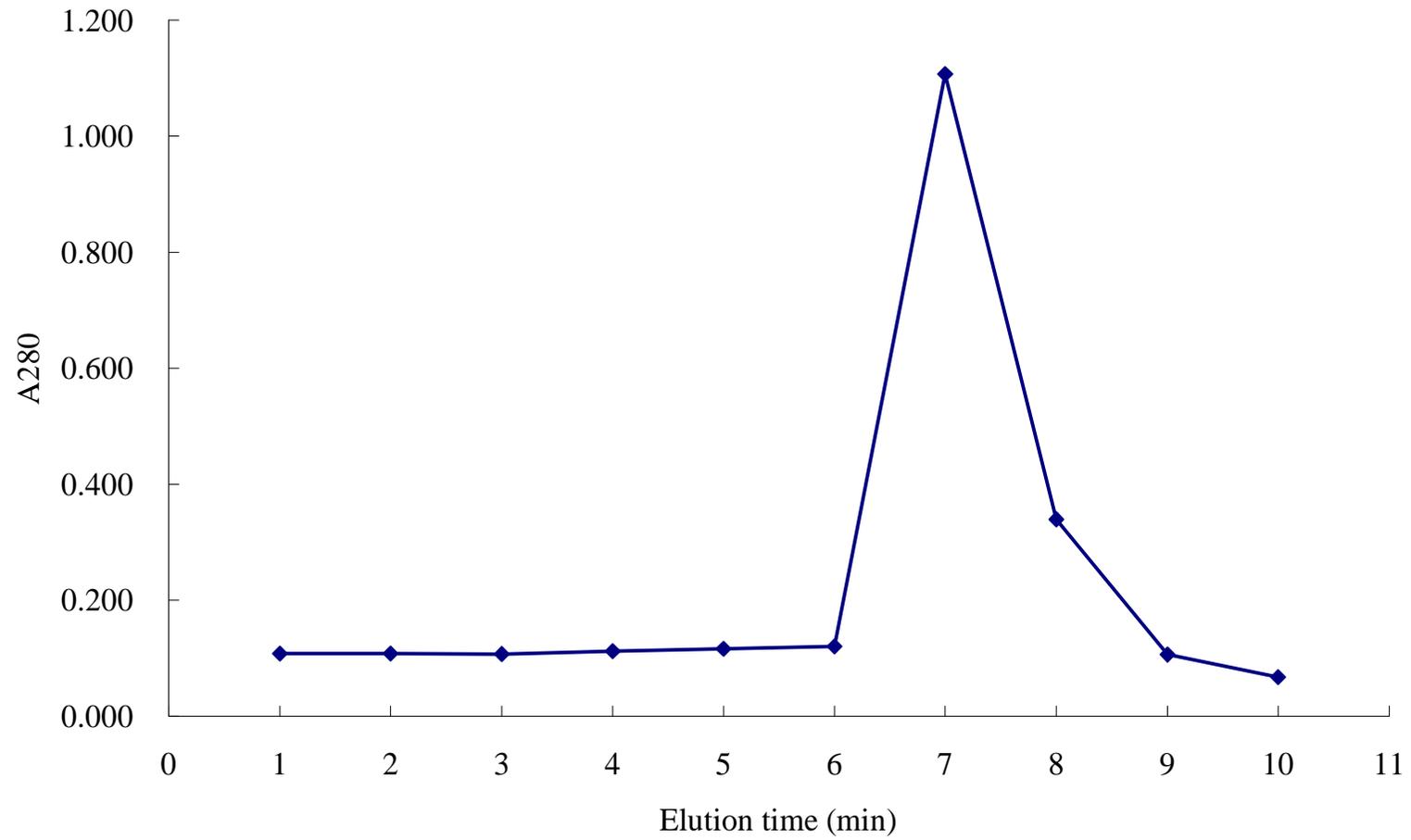
乳鐵蛋白水解液經過陽離子樹脂交換後，測定其吸光值，發現吸光值集中在第七到第八分鐘（圖），進一步收集純化之陽離子胜肽之水溶液進行後續分析與純化。

##### (二) 高效液相層析之分析

將經過陽離子樹脂純化後所收集的沖提液，進行高效液相層析的分析在 UV 280 nm 的波長下得到一分離圖譜（圖），參考 Recio & Visser（1999）與 Dionysius（1997）等人的研究結果，可發現有兩個具代表性的陽離子胜肽片段具有顯著的抑菌效果，再進一步利用製備型的管柱加以分離與收集純化（圖）。

##### (三) 抑菌胜肽的最小抑菌濃度測試

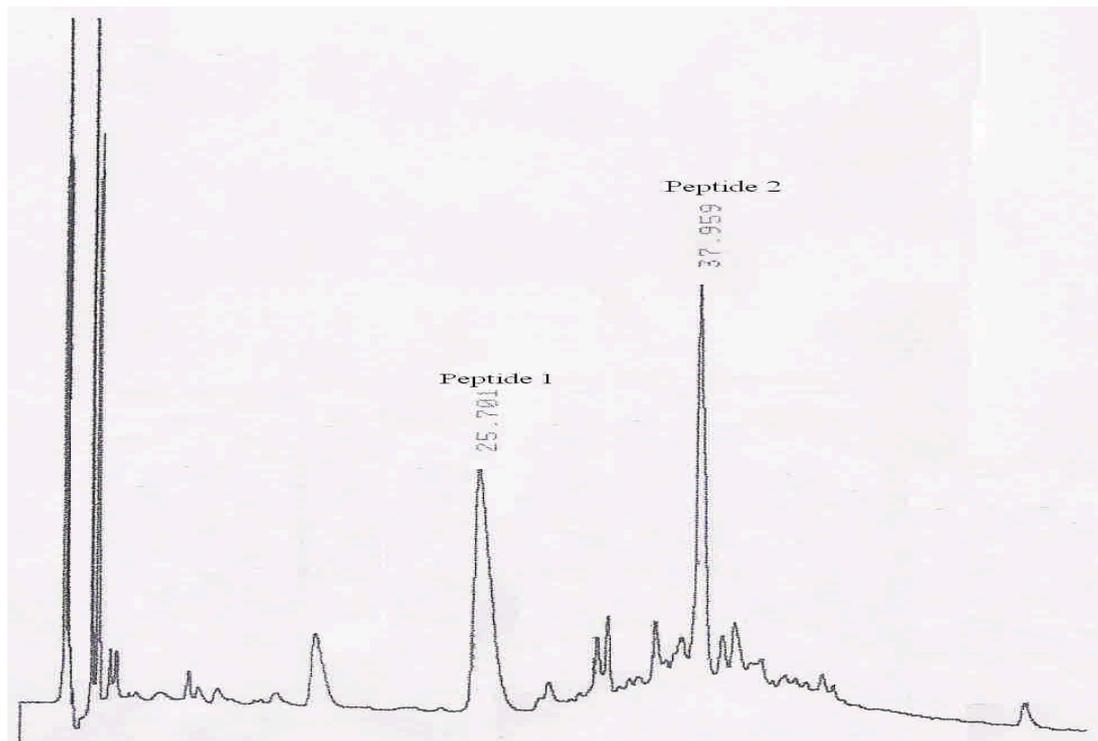
經過製備型的管柱收集之抑菌胜肽進行最小抑菌濃度測試，發現 Peptide I 在濃度 25  $\mu\text{g/ml}$  以上與乳鐵蛋白素（Peptide 2）在濃度



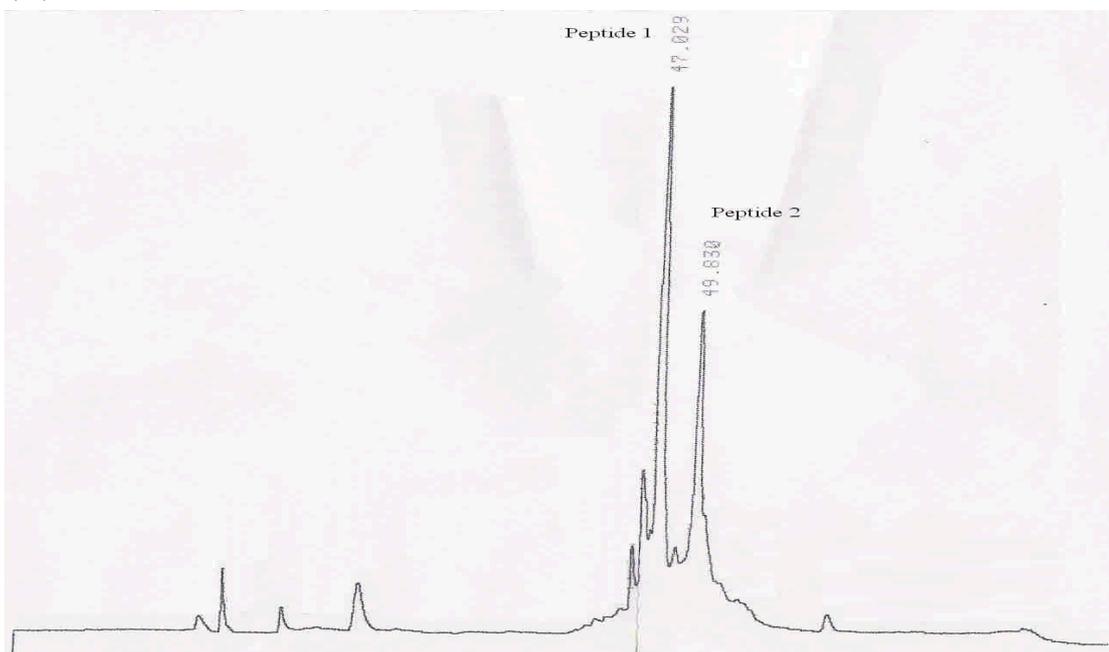
圖二十四、乳鐵蛋白水解液之陽離子交換樹脂層析圖。

Fig. 24. Cation exchange resin chromatogram of lactoferrin hydrolysate.

(A)



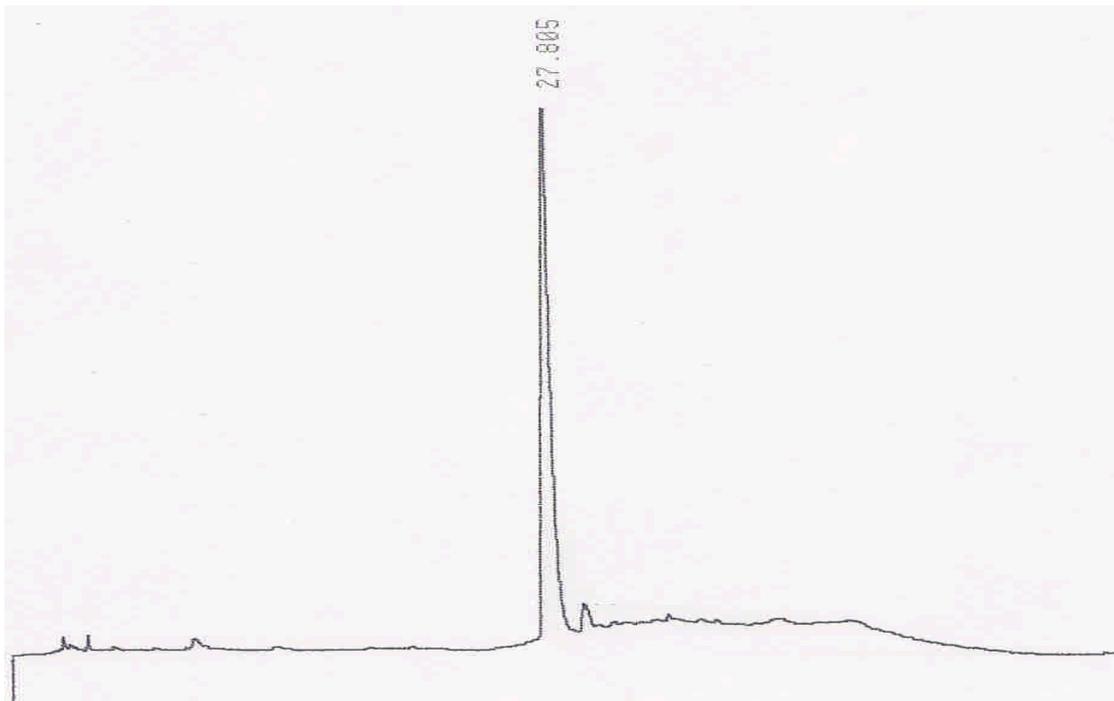
(B)



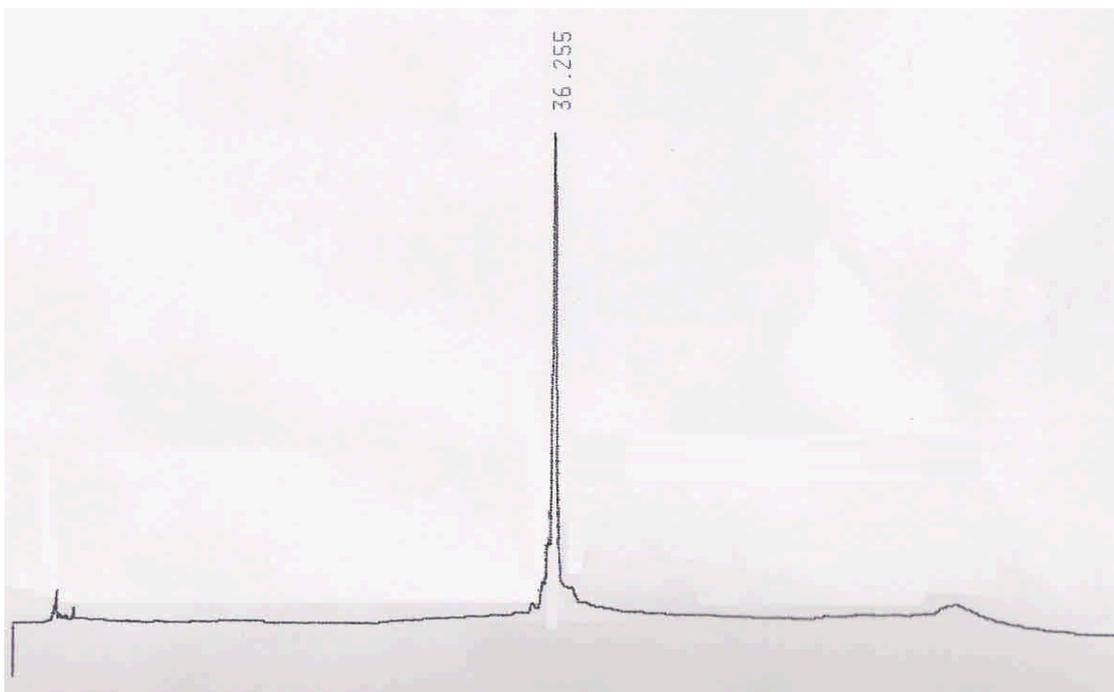
圖二十五、乳鐵蛋白水解液經陽離子樹脂純化後之高效液相層析圖  
(A)分析型 (B)製備型

Fig. 25. HPLC chromatograms of solution of lactoferrin hydrolysate purified from cation exchange resin. (A) analytical HPLC chromatogram (B) preparative HPLC chromatogram.

(A)



(B)



圖二十六、乳鐵蛋白水解液經製備型 ODS 管柱純化抗菌胜肽之高效液相層析圖 (A) peptide 1 (B) peptide 2

Fig. 26. HPLC chromatograms of antibacterial peptides of lactoferrin hydrolysate purified from preparative ODS columns. (A) peptide 1 (B) peptide 2.

50 µg/ml 以上時皆具有顯著的抑菌效果，這與之前的 Dionysius(1997) 等人研究發現，乳鐵蛋白水解液中存在具有抑菌效果之陽離子胜肽及乳鐵蛋白素相同。而本研究中將純化後之抗菌胜肽水溶液利用不同的加熱時間，觀察抗菌胜肽的抑菌效果之耐熱性，結果發現純化之抗菌胜肽在加熱後其抑菌效果並無受到影響，進一步將乳鐵蛋白水解液加熱來觀察其抑菌活性之影響。

#### (四) 乳鐵蛋白水解液中之抑菌胜肽含量

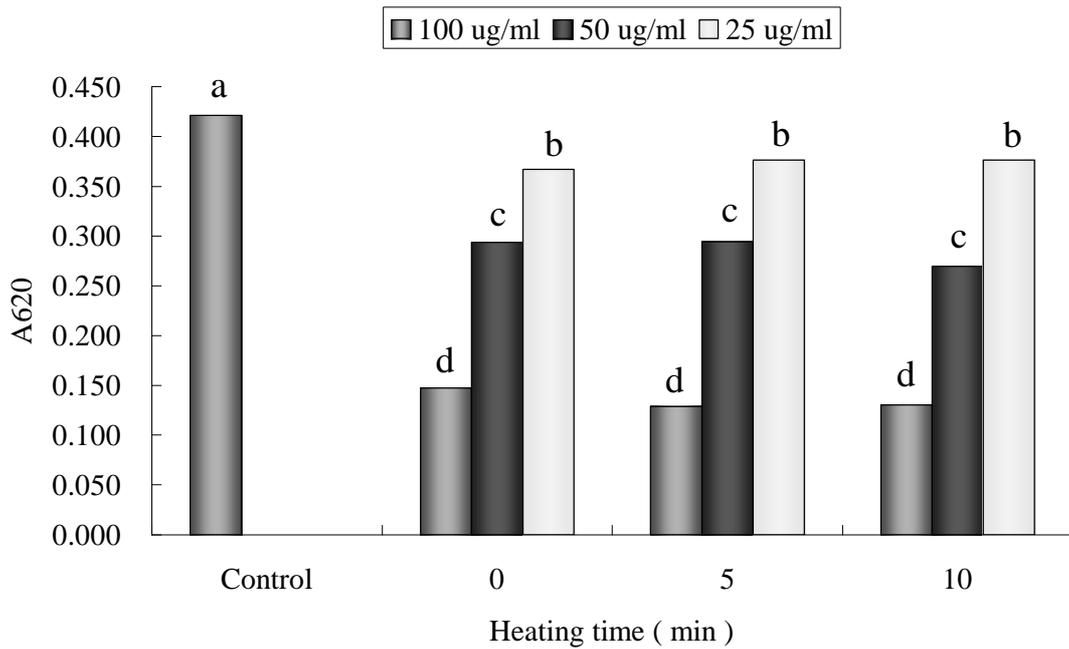
利用標準曲線計算出在乳鐵蛋白水解液中，所含有的 peptide 1 的含量為 591.3 µg/ml，而所含有的乳鐵蛋白素含量為 491.8 µg/ml。

### 五、乳鐵蛋白水解液之耐熱性

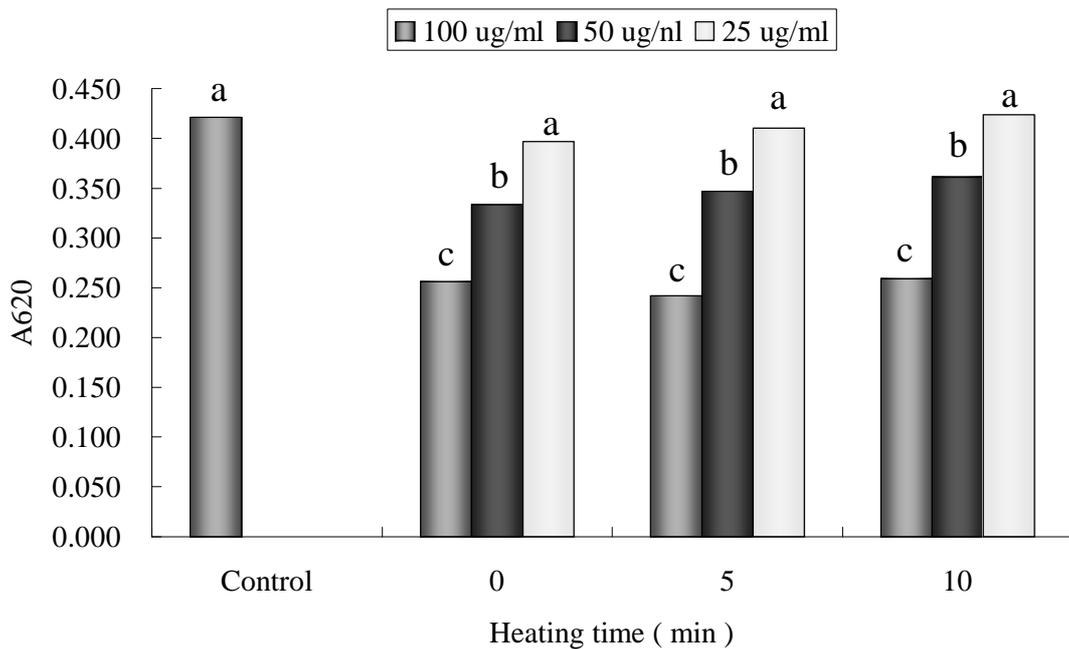
#### (一) 乳鐵蛋白水解液加熱後之抑菌效果

將乳鐵蛋白水解液濃度 125、250、500 及 1000 µg/ml，在 100°C 下加熱 0、5、10、15、20、25、30 及 60 分鐘，可觀察到乳鐵蛋白水解液有明顯的沉澱現象產生，在之前 Takase (1998) 所做的研究中提到，乳鐵蛋白素等胜肽因為其雙硫鍵結的形成或是與其它的胜肽分子之間靜電力交互作用的影響下，易形成不溶性的凝結物。在最小抑菌濃度方面的研究結果亦發現，對於兩株病原菌：革蘭氏陽性菌 (*Listeria monocytogenes*) 及革蘭氏陰性菌 (*Salmonella typhimurium*) (菌體濃度約  $10^4$  CFU/ml 之對數生長期之菌體) 之抑菌效果，不論是否加熱或加熱時間長短，乳鐵蛋白水解液之濃度為 125 µg/ml 時，都沒有抑

(A)



(B)



圖二十七、乳鐵蛋白水解液經製備型管柱純化抗菌胜肽對 *L. monocytogenes* 之抑菌效果 (A) peptide 1 (B) 乳鐵蛋白素

Fig. 27. The antibacterial activity to *L. monocytogenes* from peptides of lactoferrin hydrolysate purified from preparative ODS columns. (A) peptide 1 (B) lactoferricin

<sup>a-d</sup> Bars with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ )

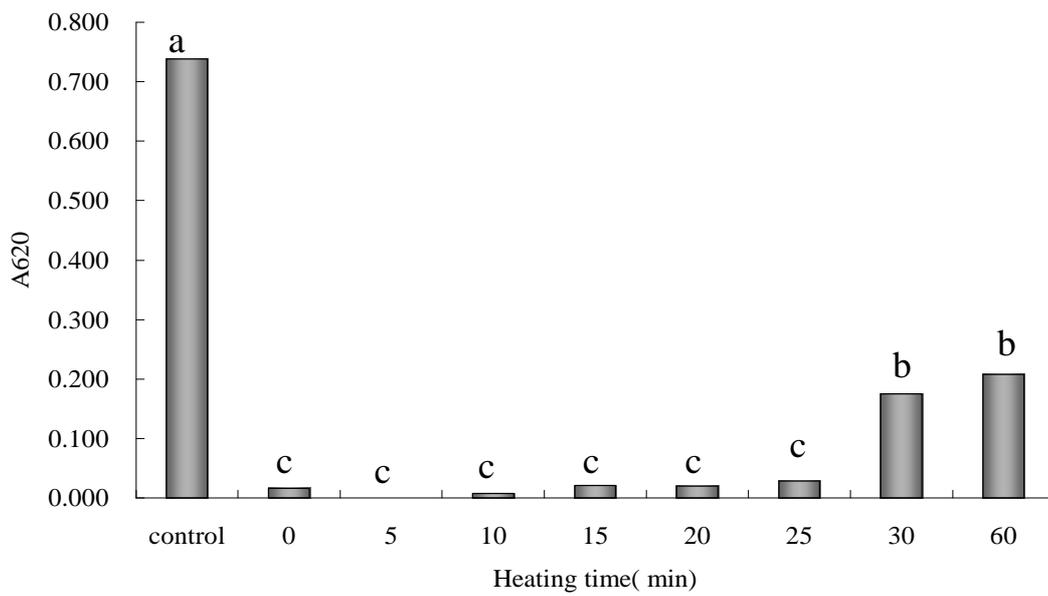
菌的效果，而濃度為 500  $\mu\text{g/ml}$ （乳鐵蛋白素約 36.96  $\mu\text{g/ml}$ ）或以上時，其對兩株病原菌皆有顯著抑制效果。當濃度為 250  $\mu\text{g/ml}$  時，未加熱之水解液對於兩株病原菌也具抑制效果，但經加熱 10 分鐘後，其對 *S. typhimurium* 的抑菌效果會顯著降低 ( $P < 0.05$ )；而加熱 30 分鐘後，對 *L. monocytogenes* 的抑菌效果會顯著的下降 ( $P < 0.05$ ) (圖)。

由實驗結果可以知道，乳鐵蛋白水解液在加熱後對於其抑菌效果的確會造成影響，且隨著加熱時間的不同影響的程度亦有所不同，且乳鐵蛋白水解液對於革蘭氏陽性菌的抑制效果，較對於革蘭氏陰性菌為佳，這與先前 Ulvatne (2004) 等人發現革蘭氏陽性菌對於乳鐵蛋白素的敏感度較高，其結果相符合，推測可能因革蘭氏陽性菌缺乏細胞外壁，而乳鐵蛋白素穿透磷壁質膜的機制有關。

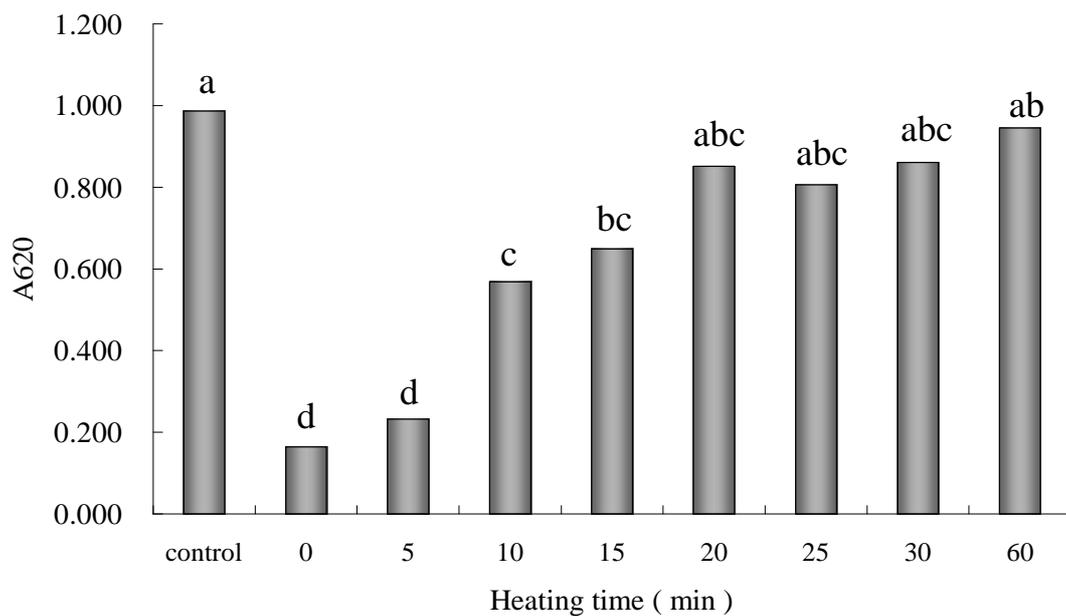
## (二) 乳鐵蛋白水解液加熱後上澄液之抑菌效果

從乳鐵蛋白水解液抑菌效果的耐熱性實驗結果，可以發現乳鐵蛋白水解液在經過加熱後的确會造成抑菌效果的下降，且抑菌的活性隨著加熱時間上升而有下降的趨勢，而參考 Takase (1998) 的研究資料推測乳鐵蛋白水解液經過加熱後，可能促使乳鐵蛋白水解液中的陽離子抗菌肽形成沉澱，進而造成抑菌效果的下降，所以將加熱 0、5 及 10 分鐘後的乳鐵蛋白水解液經過離心後，取其上澄液，分別進行對於 *L. monocytogenes* 與 *S. typhimurium* 兩株菌株的抑菌測試。實驗結果發現，隨著加熱時間上升，乳鐵蛋白水解液之上澄液

(A)



(B)



圖二十八、不同加熱時間之乳鐵蛋白水解液 (500 µg/ml) 對於(A) *L. monocytogenes* (B) *S. typhimurium* 抑菌活性之影響

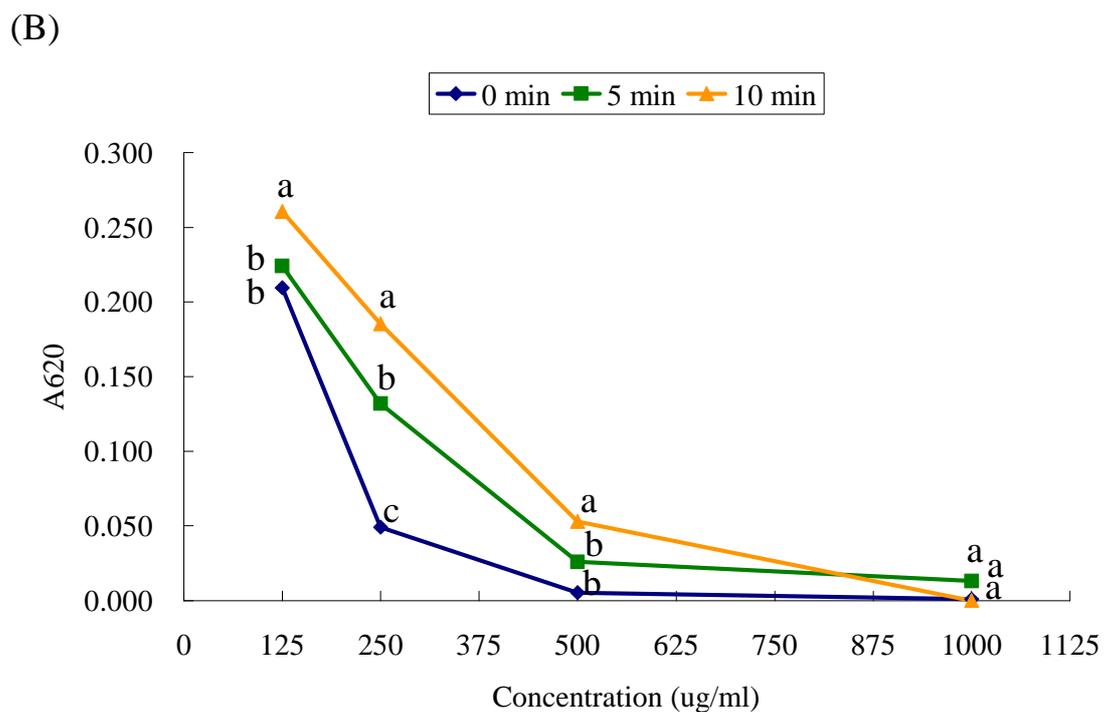
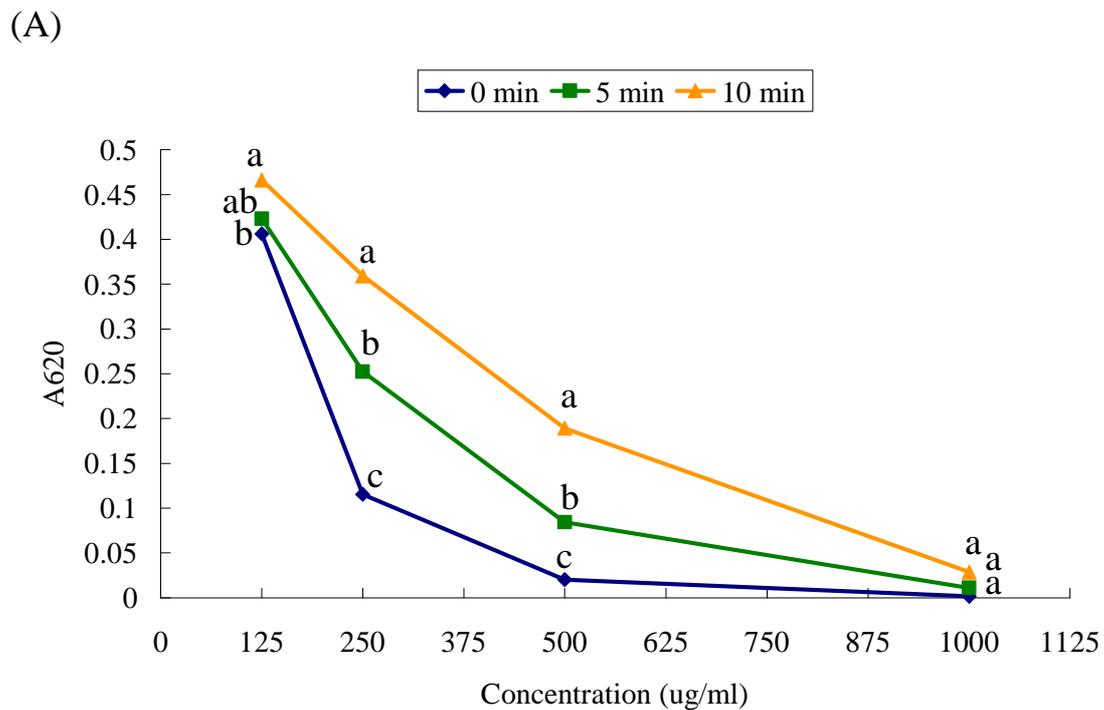
Fig. 28. The effect of lactoferrin hydrolysate (500 µg/ml) after different heating time on antibacterial activity to (A) *L. monocytogenes* (B) *S. typhimurium*.

<sup>a-d</sup> Bars with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ )

對於兩株病原菌的抑菌效果相對下降（圖）。而另一方面將乳鐵蛋白水解液加熱離心後之上澄液經過陽離子交換樹脂純化，利用高效液相層析儀分析，觀察其中所含的抗菌胜肽量之變化。

### （三） 乳鐵蛋白水解液加熱後上澄液之胜肽含量

將乳鐵蛋白水解液之上澄液經陽離子純化後，於波長 280 nm 下測定其吸光值（圖），發現隨著加熱時間增加，所收集之陽離子胜肽的濃度亦相對的下降，進一步於高效液相層析的分析型管柱系統中進行分析，發現乳鐵蛋白水解液之上澄液所含的抗菌胜肽區段的吸光值有明顯的減少，其中，未經加熱之乳鐵蛋白水解液之上澄液，其抗菌胜肽 peptide 1 及乳鐵蛋白素的濃度分別為 571.6  $\mu\text{g/ml}$  與 487.3  $\mu\text{g/ml}$ ，為未離心之乳鐵蛋白水解液中抗菌胜肽含量的百分之 97 與 99，可知乳鐵蛋白素大部分存在於乳鐵蛋白水解液之上澄液中。而加熱 5 分鐘的乳鐵蛋白水解液之上澄液中所含的 peptide 1 與乳鐵蛋白素減少為原始濃度之 62.8 及 49.9%，加熱 10 分鐘更減少為原始濃度之 36.3 與 42.8%，證實乳鐵蛋白水解液之上澄液隨加熱時間增加，其抗菌胜肽之濃度亦相對減少（表）。由此可得知，隨著加熱時間的上升，乳鐵蛋白水解液中之抗菌胜肽所形成的凝集物增加，相對的，可溶性之抗菌胜肽減少，抑菌效果亦相對下降。

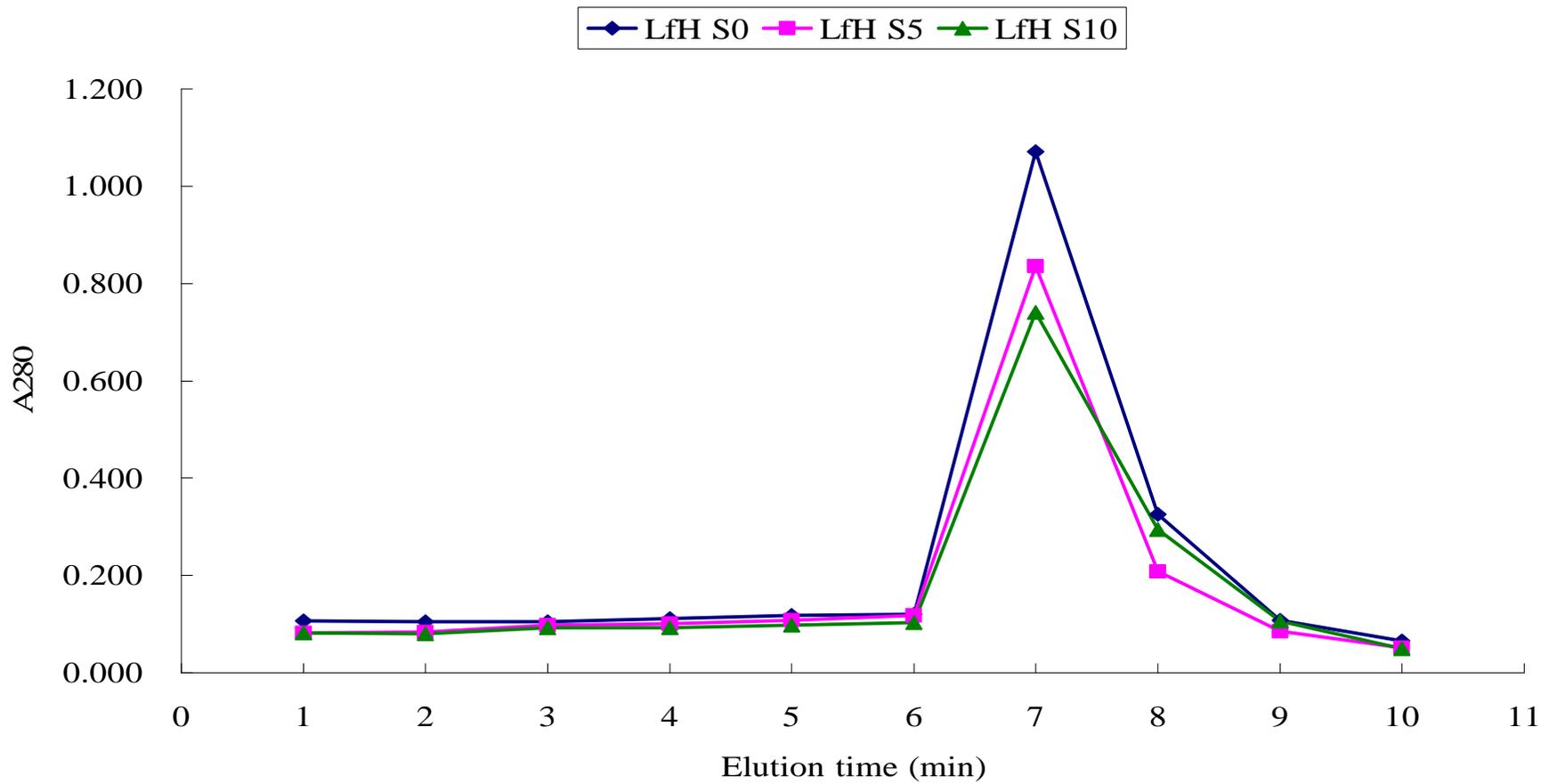


圖二十九、不同加熱時間之乳鐵蛋白水解液上澄液對於(A) *L.*

*monocytogenes* (B) *S. typhimurium* 抑菌活性之影響

Fig. 29. The effect of suspended liquid of lactoferrin hydrolysate after different heating time on antibacterial activity to (A) *L. monocytogenes* (B) *S. typhimurium*.

<sup>a-d</sup> Bars with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ )



圖三十、不同加熱時間之乳鐵蛋白水解液上澄液之陽離子樹脂層析圖

Fig. 30. The cation exchange resin chromatogram for suspending liquid of lactoferrin hydrolysate after different heating times.

| Heating time              | Peptide 1<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | loss ratio<br>(%) | Lactoferricin<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | loss ratio<br>(%) |
|---------------------------|-----------------------------------|-------------------|---------------------------------------|-------------------|
| 0 min (un-centrifugation) | 591.3                             | --                | 491.8                                 | --                |
| 0 min                     | 571.6                             | 3.3               | 487.3                                 | 0.92              |
| 5 min                     | 371.1                             | 37.2              | 245.6                                 | 50.1              |
| 10 min                    | 214.8                             | 63.7              | 210.4                                 | 57.2              |

表十一、不同加熱時間之乳鐵蛋白水解液上澄液的抗菌胜肽濃度

Table. 11. The concentration of antibacterial peptides form suspended liquid of lactoferrin hydrolysate after different heating times.

## 第二部分 牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉抗菌性及抗氧化性之探討

### 一、預備實驗

在第一部分「牛乳鐵蛋白水解液的製備與抗菌性之探討」時，分別挑選金黃葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC 9144) 及綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14207) 作為革蘭式陽性菌及陰性菌的代表測試菌株，發現牛乳鐵蛋白水解物對上述兩株病原菌的最小抑菌濃度 (minimal inhibitory concentration; MIC)，分別為 0.25 mg/mL 與 2 mg/mL (表十)。

雖然牛乳鐵蛋白水解物對上述病原菌之最小抑菌濃度在 0.25-2 mg/mL 之間，但 Jones *et al.* (1994) 報告培養基中若有牛乳或嬰兒奶粉等成分時，牛乳鐵蛋白素之添加量要增加，對 *E. coli* 才有抑菌效果。由於豬肉的組成份較培養基複雜，因此在預備試驗中，增加牛乳鐵蛋白水解物至 2 及 4 mg/mL。為比較 EDTA 之抑菌效果，故在其中一組加入 EDTA，而 EDTA 的添加濃度則是依據台灣行政院衛生署 (Department of Health, Taiwan, R.O.C.) 衛生法規之食品添加物使用範圍及用量標準，選用最高添加量，即 250 ppm 作為添加濃度。Facon *et al.* (1996) 在報告中指出增加 EDTA 及牛乳鐵蛋白水解物的濃度可以

克服部分存在於食物中抑制物質的作用，但在營養的考量下，EDTA 有法規限制其添加量。預備試驗共分成四組，第一組為控制組；第二組為 EDTA 組 (250 ppm)；第三組為 4 mg 牛乳鐵蛋白水解物/g meat 組 (4 mg bLFH/g 組)；第四組為 2 mg bLFH/g 組，將上述添加物加入豬後腿絞肉後，在 4°C 下貯藏 0、2、4 及 6 天。

圖三十一為添加不同濃度之牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉於貯藏期間 (4°C) 總生菌數的影響。在六天的冷藏期限內，控制組與各處理組的總生菌數皆隨貯存時間的增加而有上升，且 2 mg bLFH/g 組於貯藏期間 (4°C) 無法減少豬肉之總生菌數，但是當提高水解物的添加量 (4 mg bLFH/g 組) 時，於冷藏的第 0、4 及 6 天，4 mg bLFH/g 組的總生菌數皆明顯低於控制組 ( $p < 0.05$ )，且於冷藏第 2、4 及 6 天，4 mg bLFH/g 組的總生菌數皆明顯較 2 mg bLFH/g 組低 ( $p < 0.05$ )。在六天的冷藏期限內，於第 0 天，EDTA 組的總生菌數明顯低於 4 mg bLFH/g 組 ( $p < 0.05$ )，但於其他貯藏時間，兩組之總生菌數皆無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。EDTA 組的總生菌數於六天的冷藏期限內，皆顯著低於控制組 ( $p < 0.05$ )。

圖三十二為添加不同濃度之牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉總生菌數 (各貯藏時間之平均值) 的影響。整體而言，2 mg

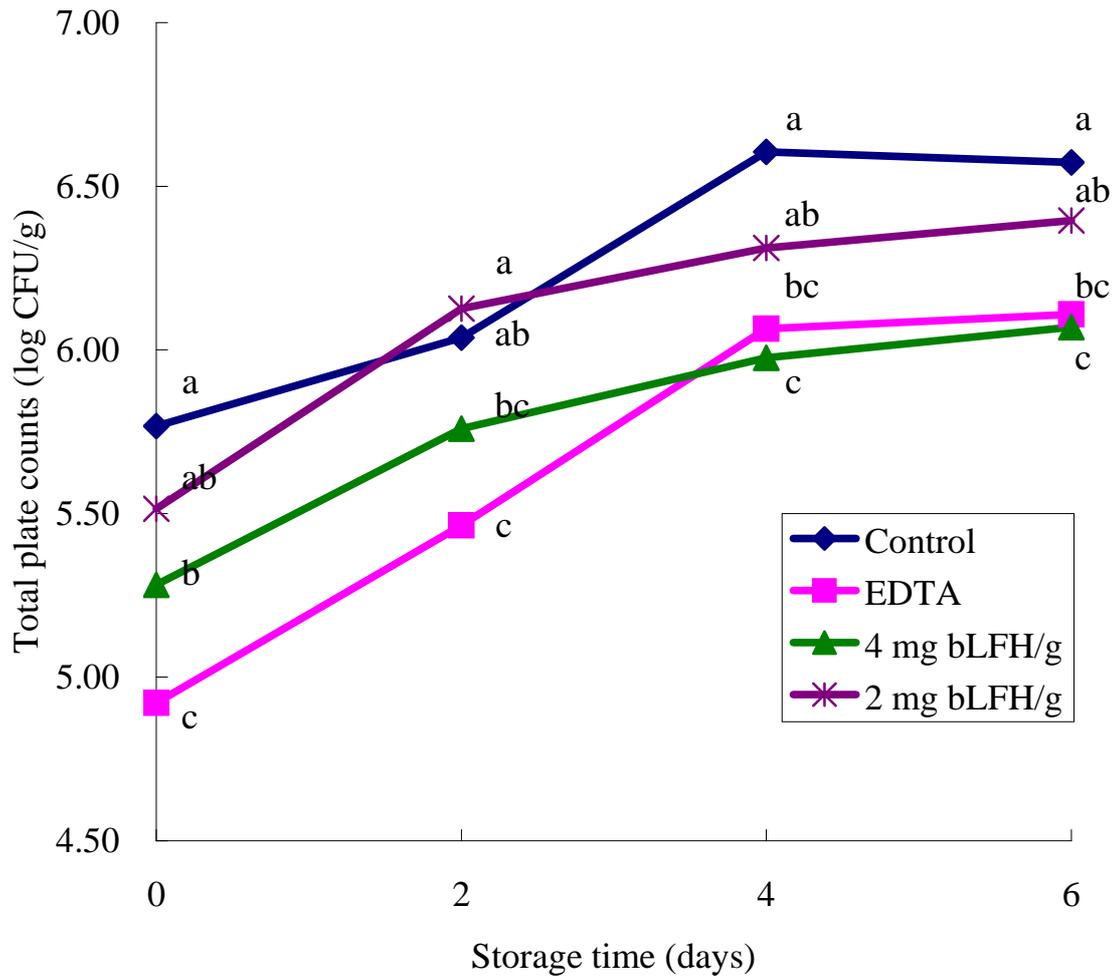
bLFH/g 組、4 mg bLFH/g 組及 EDTA 組之總生菌數分別較控制組減少 0.16、0.47 及 0.61 個對數值 (log CFU/mL)，但僅 4 mg bLFH/g 組與 EDTA 組的總生菌數顯著低於控制組 ( $p < 0.05$ )，故以添加 4 mg bLFH/g meat (2 倍最小抑菌濃度量) 至豬後腿絞肉中來進行爾後的實驗。Venkitanarayanan *et al.* (1999) 發現添加 100  $\mu\text{g/mL}$  的牛乳鐵蛋白素於 1% peptone 中，能使 *E. coli* O157:H7 下降約 2 個對數值；但是添加相同濃度的牛乳鐵蛋白素至絞碎牛肉中，於冷藏期間 (4°C/5 天；10°C/3 天)，卻無法顯著減少總生菌數的生長。

## 二、水分含量與粗脂肪分析

豬後腿絞肉之水分含量及粗脂肪含量分別介於 75.00-75.51% 與 0.22-0.28% 之間 (表十二)，且各組之間沒有顯著差異 ( $p > 0.05$ )。由此可知，添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 並不會影響豬後腿絞肉的水分與粗脂肪含量。

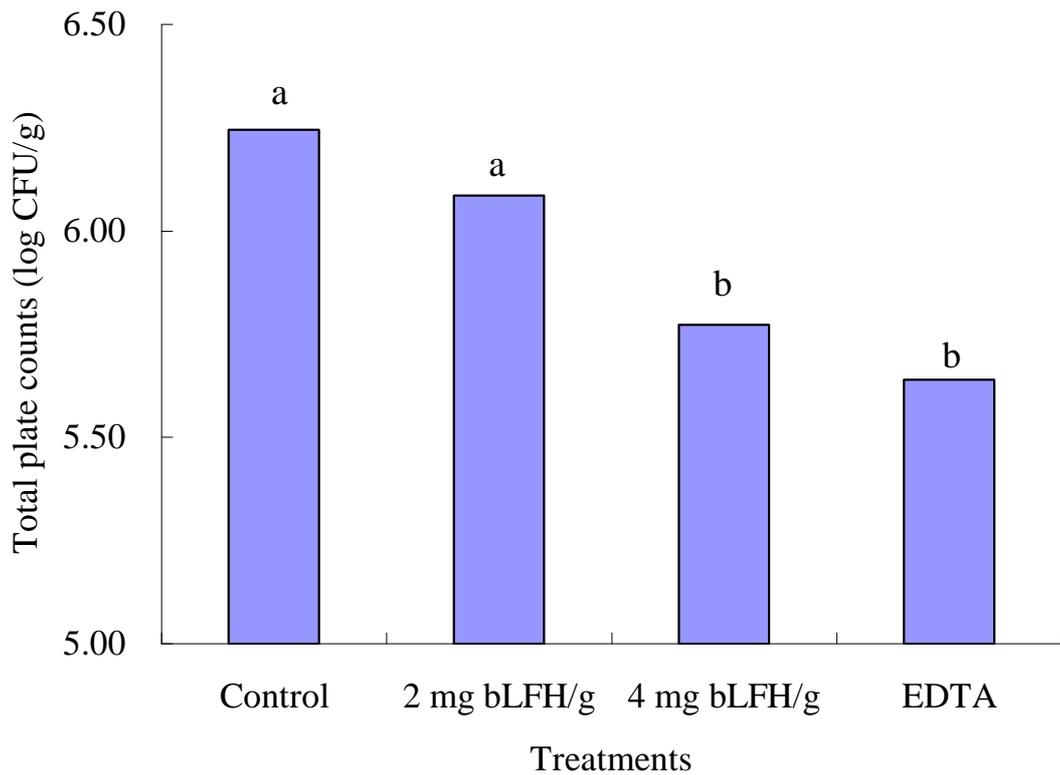
## 三、脂肪氧化酸敗程度測定

TBARS 值 (thiobarbituric acid-reactive substance value) 為脂質氧化酸敗程度的指標，主要是測定油脂中含有三個以上雙鍵的不飽和脂肪酸，經氧化後所產生的二級氧化產物—丙二醛 (malonaldehyde; MDA) 的量。氧化酸敗情形愈嚴重，產生的丙二醛則愈多，丙二醛



圖三十一、添加不同濃度之牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉於貯藏期間 (4°C) 總生菌數的影響。

Fig. 31. Effects of bovine lactoferrin hydrolysate (bLFH) and EDTA on total plate counts of ground hams during storage at 4°C for 6 days. <sup>a-c</sup>Means within a storage period having different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).



圖三十二、添加不同濃度之牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉總生菌數 (各貯藏時間之平均值) 的影響。

Fig. 32. Effects of bovine lactoferrin hydrolysate (bLFH) and EDTA on total plate counts (pooled data over storage time) of ground hams. <sup>a-b</sup>Bars with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

表十二、 添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對於豬後腿絞肉水分及粗脂肪的影響

Table 11. Effects of bovine lactoferrin hydrolysate (bLFH) and EDTA on moisture content and crude fat of ground hams

| Treatments <sup>1</sup> | Moisture (%) | Crude fat (%) |
|-------------------------|--------------|---------------|
| Control                 | 75.51±0.28   | 0.22±0.06     |
| EDTA                    | 75.33±0.34   | 0.28±0.10     |
| 4 mg bLFH/g             | 75.00±0.32   | 0.22±0.06     |
| 4 mg bLFH/g +EDTA       | 75.45±1.05   | 0.28±0.10     |

<sup>1</sup>Control: without adding bovine lactoferrin hydrolysate (bLFH) and EDTA.

EDTA: added 250 ppm EDTA.

4 mg bLFH/g: added 4 mg bLFH/g meat (2 × MIC).

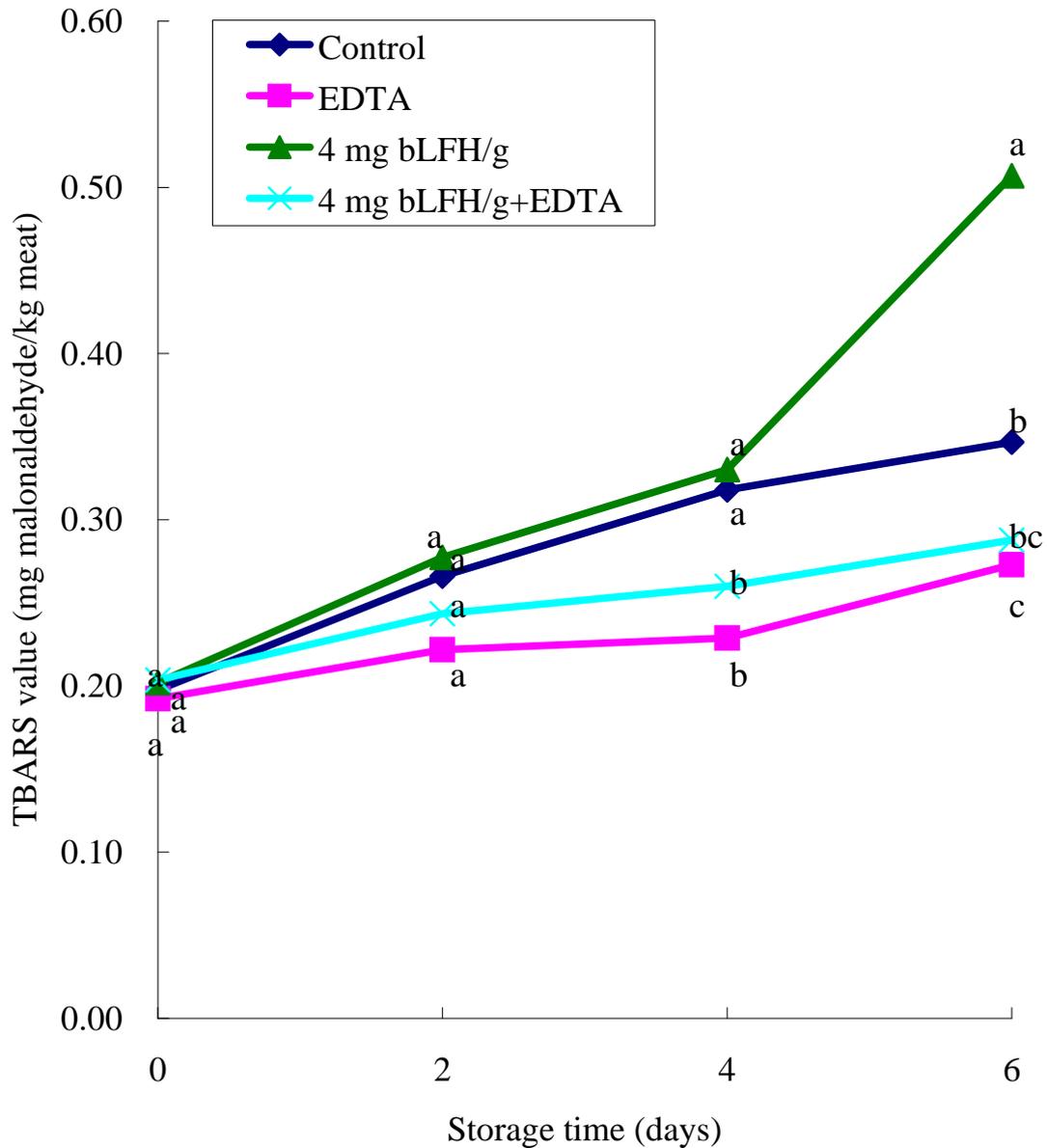
4 mg bLFH/g+EDTA: added 4 mg bLFH/g meat (2 × MIC) and 250 ppm EDTA.

與硫巴比妥酸試劑 (TBA reagent) 中的硫巴比妥酸 (2-thiobarbituric acid; TBA) 反應生成之紅色物質也愈多，以分光光度計測定 538 nm 下的吸光值就會愈高。

圖三十三為添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉於貯藏期間 (4°C) TBARS 值的影響。在六天的冷藏期限內，控制組與各處理組的 TBARS 值會隨貯存時間的增加而有顯著的上升 ( $p < 0.05$ )，但於冷藏的第 0 天及第 2 天，控制組與各處理組之 TBARS 值並沒有顯著差異 ( $p < 0.05$ )；於冷藏的第 4 天，控制組與 4 mg bLFH/g 組的 TBARS 值則顯著高於 EDTA 組與 4 mg bLFH/g+EDTA 組 ( $p < 0.05$ )。於冷藏的第 6 天，4 mg bLFH/g 組之 TBARS 值顯著高於控制組 ( $p < 0.05$ )，又控制組之 TBARS 值顯著高於 EDTA 組與 4 mg bLFH/g+EDTA 組 ( $p < 0.05$ )。顯示添加牛乳鐵蛋白水解物於冷藏後期會促進脂肪氧化，但若同時添加 EDTA 則可改善此促氧化現象。水解物的促進脂質氧化現象，可能原因為本次實驗所使用之牛乳鐵蛋白並非鐵飽和度低於 5% 之 apolactoferrin，而是鐵飽和度 ( $\leq 8\%$ ) 較高的牛乳鐵蛋白。牛乳鐵蛋白於水解過程中會將鐵釋放出來，故凍乾後的水解物中可能含有鐵，這可解釋 4 mg bLFH/g 組的非血基質鐵 (游離鐵) 含量較控制組高的現象 (圖四十三)。此外，實驗結果顯示 TBARS 值與肉中非血基質鐵的含量呈顯著 ( $p < 0.05$ ) 的正相關 (0.50713)。

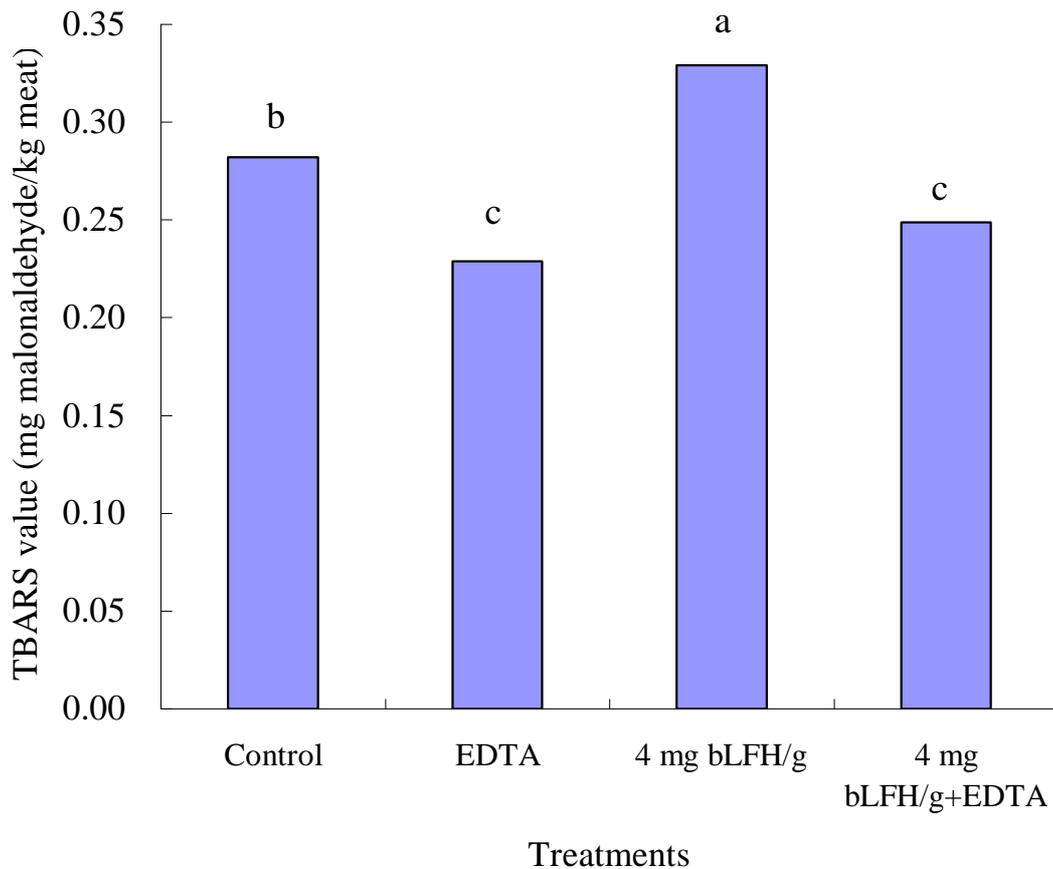
Kanner *et al.* (1989) 發現游離鐵在肉製品的脂質氧化過程中扮演重要的催化角色。

圖三十四為添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉 TBARS 值 (各貯藏時間之平均值) 的影響。整體而言, 於豬後腿絞肉中添加水解物會明顯的促進脂肪氧化 ( $p > 0.05$ ), 而添加 EDTA 則可明顯減少脂質氧化情形的發生 ( $p < 0.05$ ), 甚至可完全抑制住水解物的促氧化性。Halliwell and Gutteridge (1990) 指出所有結構簡單的鐵複合物都會使過氧化氫 (hydrogen peroxide;  $H_2O_2$ ) 分解產生氫氧自由基 (hydroxyl radicals;  $\cdot OH$ ), 而 Ahn *et al.* (1993) 則發現當鐵被鐵結合物質 (iron binders) 或是鐵貯存蛋白 (iron storage proteins), 如運鐵蛋白 (transferrin) (Halliwell and Gutteridge, 1986) 螯合住, 則只會對脂質氧化反應產生極微弱 (甚至沒有) 的催化作用。而肉中的游離鐵則會透過上面的反應式將脂質過氧化物 (lipid peroxides; ROOH) 分解, 反應所生成的過氧自由基 (peroxyl;  $ROO\cdot$ ) 及烷氧自由基 (alkoxyl;  $RO\cdot$ ) 會再攻擊其他脂質分子, 從鄰近的脂肪酸側鏈上再捕獲氫原子刺激多元不飽和脂肪酸 (RH) 過氧化, 如此連鎖進行脂質過氧化反應, 所生成的氫氧自由基 ( $\cdot OH$ ) 則會隨意氧化大部分的食品組成 (Walling, 1975)。



圖三十三、 添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉於貯藏期間 (4°C) TBARS 值的影響。

Fig. 33. Effects of bovine lactoferrin hydrolysate (bLFH) and EDTA on TBARS values of ground hams during storage at 4°C for 6 days. <sup>a-c</sup>Means within a storage period having different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).



圖三十四、添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉 TBARS 值 (各貯藏時間之平均值) 的影響。

Fig. 34. Effects of bovine lactoferrin hydrolysate (bLFH) and EDTA on TBARS values (pooled data over storage time) of ground hams. <sup>a-c</sup>Bars with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

#### 四、酸鹼值

圖三十五為添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉於貯藏期間 (4°C) 酸鹼值的影響。在六天的冷藏期限內，控制組與各處理組的酸鹼值會隨冷藏時間的增加而有顯著的上升 ( $p < 0.05$ )，其原因可能是由於細菌大量繁殖所致 (Gill and Newton, 1987)，好氣包裝豬肉於冷藏期間，主要的腐敗菌為假單胞菌 (*Pseudomonas* spp.) (Ayres, 1960; Coates *et al.*, 1995)，而假單胞菌會以胺基酸作為碳源，所產生的氨會使肉品的酸鹼值增加 (丘和吳，2003)。添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 並不會影響豬後腿絞肉的酸鹼值 ( $p > 0.05$ )。

有文獻指出乳鐵蛋白素在 pH 5.5 到 7.5 的條件下所表現出來的抗菌活性最強 (Bellamy *et al.*, 1992b; Wakabayashi *et al.*, 1992)。實驗結果顯示，於六天的冷藏期限內，絞碎豬後腿肉的酸鹼值介於 5.92-6.00 之間，此條件有利於水解物的抗菌表現。

#### 五、添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉於貯藏期間 (4°C) 微生物的影響

於好氣包裝下之冷藏生鮮肉品中，較常見的革蘭氏陰性腐敗菌種有 *Pseudomonas*、*Moraxella*、*Psychrotrophic* 及 *Acinetobacter* (Molin *et al.*, 1982, 1986; Shaw *et al.*, 1982, 1984, 1988; Prieto *et al.*, 1992a, b;

Drosinos *et al.*, 1995a)。某些低溫性腸內細菌科 (Enterobacteriaceae) 常見於冷藏肉品中。這些微生物能在好氣條件下生長於脂肪組織及高酸鹼值 (> 6) 之肌肉組織中，且好生長於豬肉及羊肉 (Grau, 1981; Dainty *et al.*, 1992)，其適合生長的溫度 $\geq 4^{\circ}\text{C}$  (Blickstad *et al.*, 1983)。而肉品中常見的革蘭氏陽性菌則有微球菌 (micrococci)、乳酸菌 (lactic acid bacteria) 及 *Brochothrix thermosphacta* (Davies *et al.*, 1998)。

由於微生物會分解肉中的蛋白質和脂質，產生短鏈蛋白質和脂肪代謝產物，因而造成不良的風味、氣味或毒素等，使得生鮮肉品的品質下降 (Davies *et al.*, 1998)，故本實驗於豬後腿絞肉中添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA，探討在六天的冷藏 ( $4^{\circ}\text{C}$ ) 期限內微生物含量的變化情形。

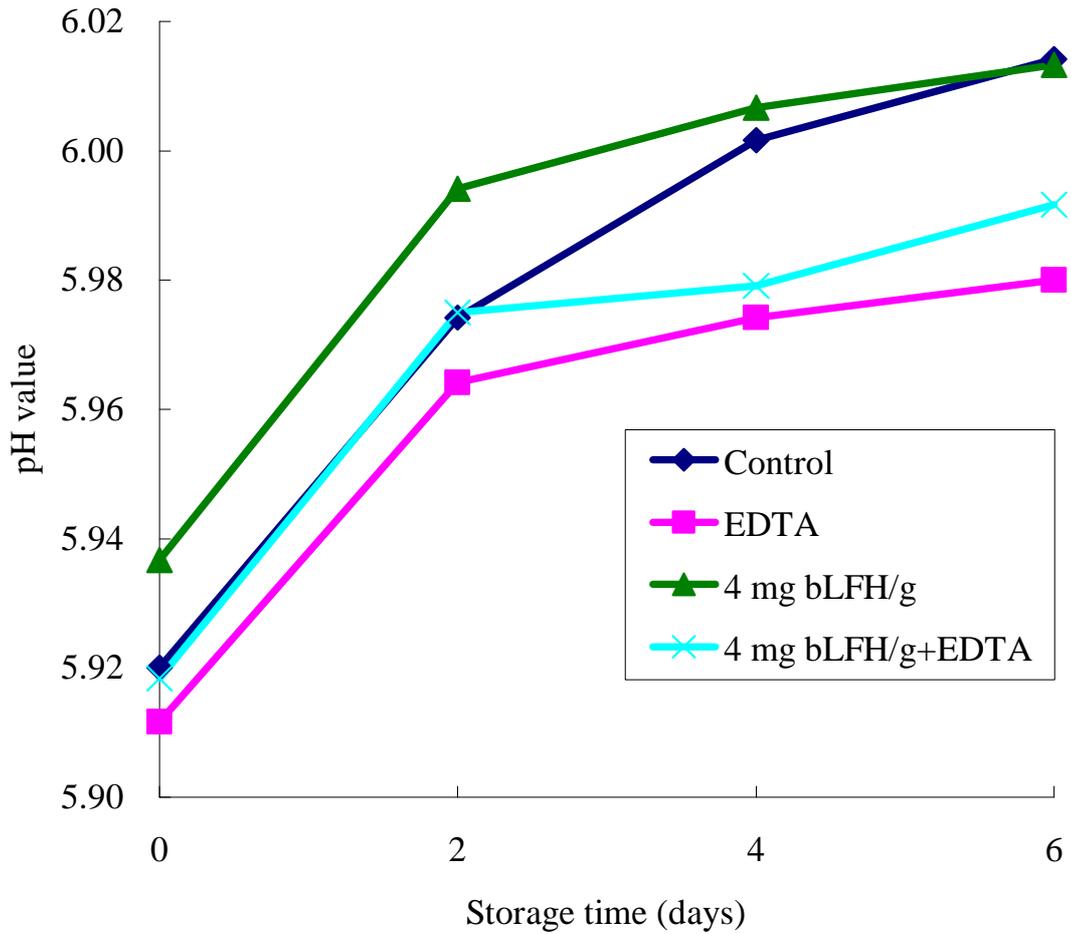
#### (一) 總生菌數

圖三十六為添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉於貯藏期間 ( $4^{\circ}\text{C}$ ) 總生菌數的影響。於六天的冷藏期限內，控制組與各處理組的總生菌數皆隨貯存時間的增加而有顯著的上升 ( $p < 0.05$ )。於冷藏的第 0 天及第 4 天，各處理組的總生菌數皆低於控制組，但是控制組與 4 mg bLFH/g 組及 EDTA 組的總生菌數並沒有顯著差異 ( $p$

$> 0.05$ )，只與 4 mg bLFH/g+EDTA 組的總生菌數有顯著差異 ( $p < 0.05$ )，這表示同時添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 至豬後腿絞肉，可於冷藏期間對總生菌數表現出協同抗菌效果。於冷藏的第 6 天，各處理組的總生菌數皆顯著低於控制組 ( $p < 0.05$ )，但各處理組之間沒有顯著差異 ( $p > 0.05$ )。

圖三十七為添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉總生菌數 (各貯藏時間之平均值) 的影響。整體而言，添加 250 ppm 的 EDTA 及 4 mg bLFH/g meat 於豬後腿絞肉中，可使總生菌數的生長情形分別減少 0.62 及 0.51 個對數值 (log CFU/mL)，但若合併添加水解物與 EDTA 則可減少 0.82 個對數值。結果顯示添加牛乳鐵蛋白水解物及/或 EDTA 至豬後腿絞肉，可明顯減緩總生菌數的生長情形，然而 EDTA 組、4 mg bLFH/g 組與 4 mg bLFH/g+EDTA 組之間沒有顯著差異 ( $p > 0.05$ )，但是從圖三十六及圖三十七的趨勢可以看出水解物與 EDTA 之間存在協同抗菌作用。

有文獻指出溫度、酸鹼值、水活性、起始菌數 (microbial load)、離子濃度以及食物的組成分皆會影響到乳鐵蛋白素的抗菌表現 (Jones *et al.*, 1994; Wakabayashi *et al.*, 1992)。隨著溫度的下降，菌體細胞膜上脂肪酸乙醯鏈的雙鍵數會增加，以維持細胞膜的流動性，使

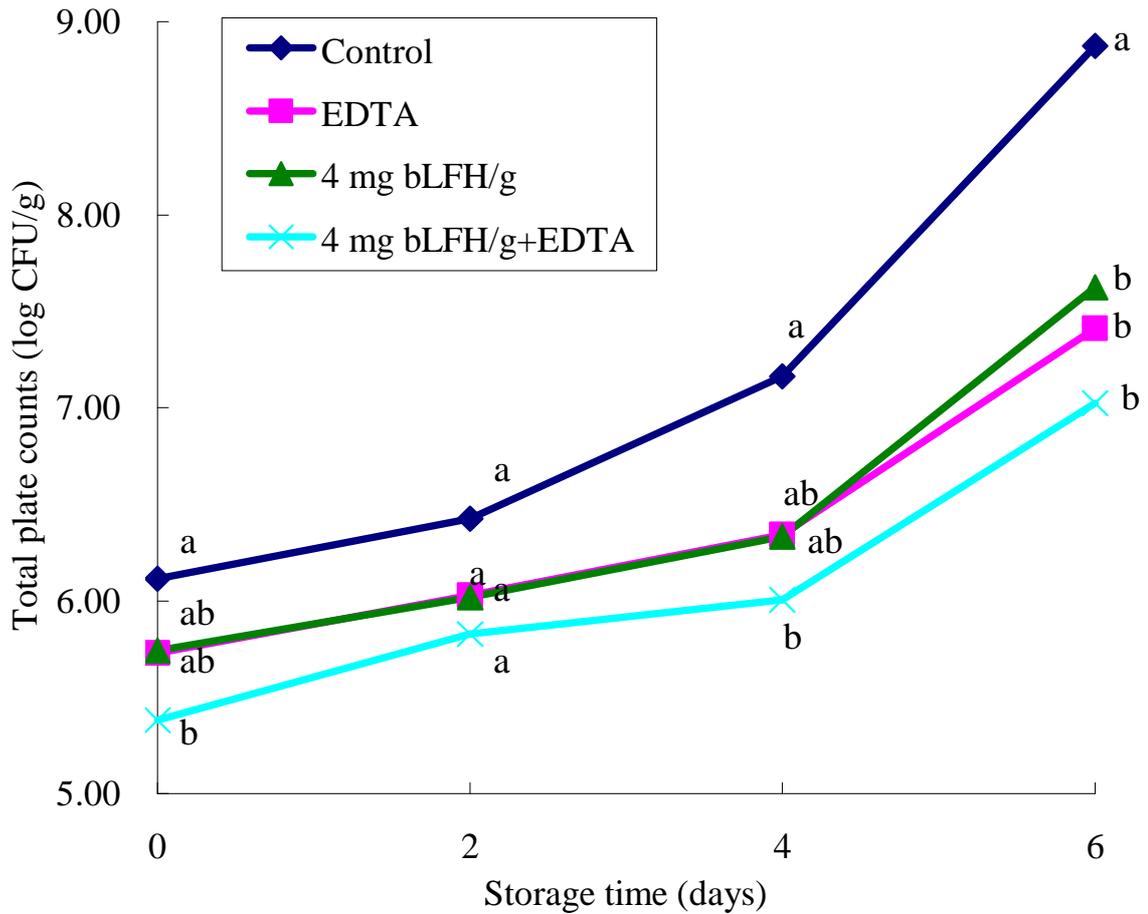


圖三十五、添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉於貯藏期間 (4°C) 酸鹼值的影響。

Fig. 35. Effects of bovine lactoferrin hydrolysate (bLFH) and EDTA on pH values of ground hams during storage at 4°C for 6 days.

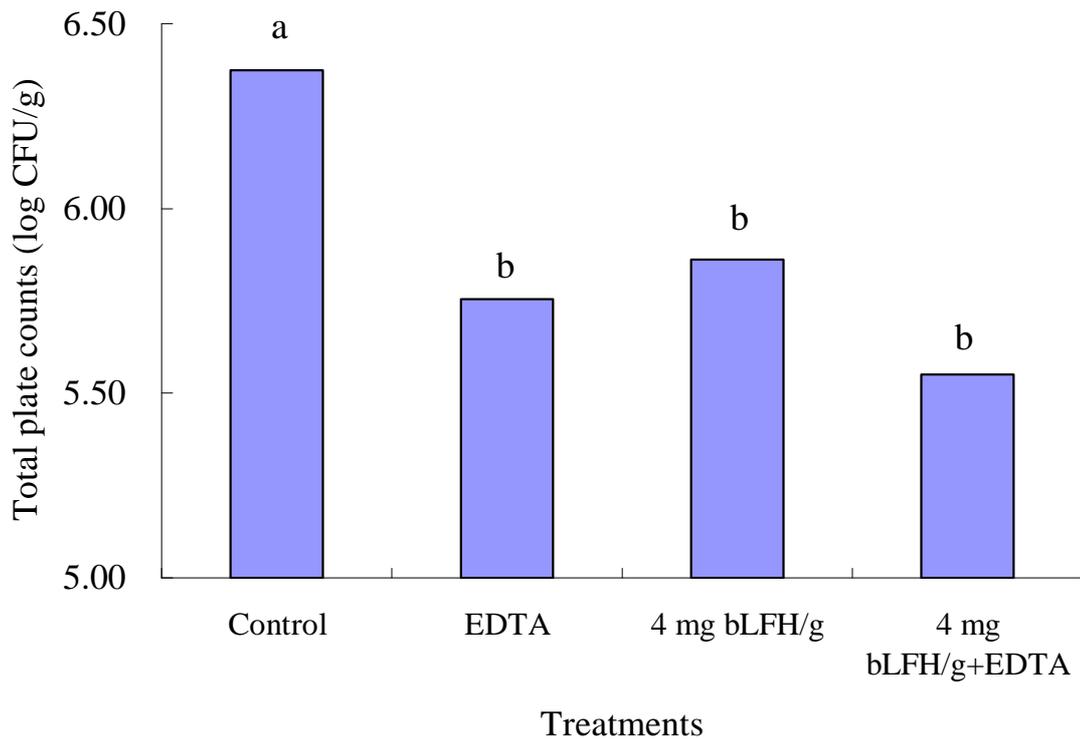
細胞膜上的代謝活動持續進行。但是，雙鍵卻會讓乙醯鏈糾纏在一起，使得細胞膜上磷脂質的穩定度下降，因此，牛乳鐵蛋白素在低溫下有較好的抗菌表現 (Vorland *et al.*, 1999)。本實驗所選用的測試溫度 (4°C) 是選用一般在家及零售商店貯藏肉品所使用的溫度，結果顯示添加牛乳鐵蛋白水解物至豬後腿絞肉中，於該冷藏溫度下能表現出抗菌效果。

Bellamy *et al.* (1992b) 及 Wakabayashi *et al.* (1992) 皆指出乳鐵蛋白素在 pH 5.5 到 7.5 的條件下所表現出來的抗菌活性最強。Bellamy *et al.* (1993) 使用 1% peptone 作為微生物的培養液，發現牛乳鐵蛋白素在 pH 6.0 時，最容易與 *Escherichia coli* 的表面結合，在 pH 7.5 時則是最容易與 *Bacillus subtilis* 的表面結合。Chantaysakorn *et al.* (2000) 發現牛乳鐵蛋白之胃蛋白酶水解物在 pH 7 的 PYG 培養液 (peptone-yeast-glucose broth) 中對 *E. coli* 的抗菌表現優於在 pH 4 的條件下。本次實驗結果顯示，於六天的冷藏期限內，絞碎豬後腿肉的酸鹼值介於 5.92-6.00 之間，此條件有利於水解物的抗菌表現 (圖三十五)。



圖三十六、添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉於貯藏期 (4°C) 總生菌數的影響。

Fig. 36. Effects of bovine lactoferrin hydrolysate (bLFH) and EDTA on total plate counts of ground hams during storage at 4°C for 6 days. <sup>a-b</sup>Means within a storage period having different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).



圖三十七、添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉總生菌數 (各貯藏時間之平均值) 的影響。

Fig. 37. Effects of bovine lactoferrin hydrolysate (bLFH) and EDTA on total plate counts (pooled data over storage time) of ground hams. <sup>a-b</sup>Bars with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Chantaysakorn *et al.* (2000) 添加牛乳鐵蛋白之胃蛋白酶水解物到胡蘿蔔汁中，發現水解物的濃度在 10 mg/mL 以下時對 *E. coli* 沒有抗菌效果；當胡蘿蔔汁經過膜過濾，去除 10 kD 以上可能會與水解物中抗微生物肽結合的大分子（如大型蛋白分子或碳水化合物），水解物抗 *E. coli* 的效果有稍微提升；將胡蘿蔔汁過濾去除 500 Da 以上的分子後，發現水解物在胡蘿蔔汁濾液中抗 *E. coli* 的效果會更加提升；然而，將水解物添加在兩種胡蘿蔔汁濾液（10 kD 與 500 Da cutoff）中，並於 23°C 下培養 24 小時後，處理組 *E. coli* 的生長情形與控制組無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。Chantaysakorn *et al.* (2000) 又將胡蘿蔔汁濾液以透析的方式去除分子量在 12,000-14,000 以下的分子，發現將水解物添加在透析液中，並於 23°C 下培養 24 小時後，可對 *E. coli* 表現出殺菌效果。證實在胡蘿蔔汁中會影響乳鐵蛋白素抗菌表現的成分為低分子量之物質，且該物質可經由透析的方式去除。證實食品中分子量在 500 Da 以上的大分子確實會影響到水解物的抗菌表現，然而最主要的影響成分為分子量在 12,000-14,000 以下的小分子物質，且極有可能為鹽類中的金屬離子。又有研究指出單價及二價陽離子會降低乳鐵蛋白素的抑菌表現，像是 10-100 mM 的氯化鈉 (sodium chloride; NaCl) 或氯化鉀 (potassium chloride; KCl) (Dionysius *et al.*, 1997)、100 mM 的氯化銨 (ammonium chloride; NH<sub>4</sub>Cl) 及 1-5 mM 的氯化鎂

(magnesium chloride;  $MgCl_2$ ) 或氯化鈣 (calcium chloride;  $CaCl_2$ ) (Wakabayashi *et al.*, 1992), 故本實驗同時添加水解物與 EDTA 至豬後腿絞肉中, 希望藉由 EDTA 來螯合肉中的游離金屬離子, 以提升水解物中陽離子抗微生物胜肽 (含牛乳鐵蛋白素) 的抗菌表現, 但是效果並不顯著 ( $p > 0.05$ ), 可能原因為肉中的大分子營養物質 (如蛋白質) 會阻斷水解物與 EDTA 的協同作用。Jones *et al.* (1994) 證實在 1% peptone 中添加 5% 全脂牛乳會完全抑制住牛乳鐵蛋白素的抗菌活性。然而, 環境中含有 10 mg/mL 以下的單糖 (如葡萄糖) 及雙糖 (如果糖、麥芽糖) 則不會影響到牛乳鐵蛋白素對 *Listeria monocytogenes* 的抗菌表現 (Wakabayashi *et al.*, 1992)。

## (二) 乳酸菌數

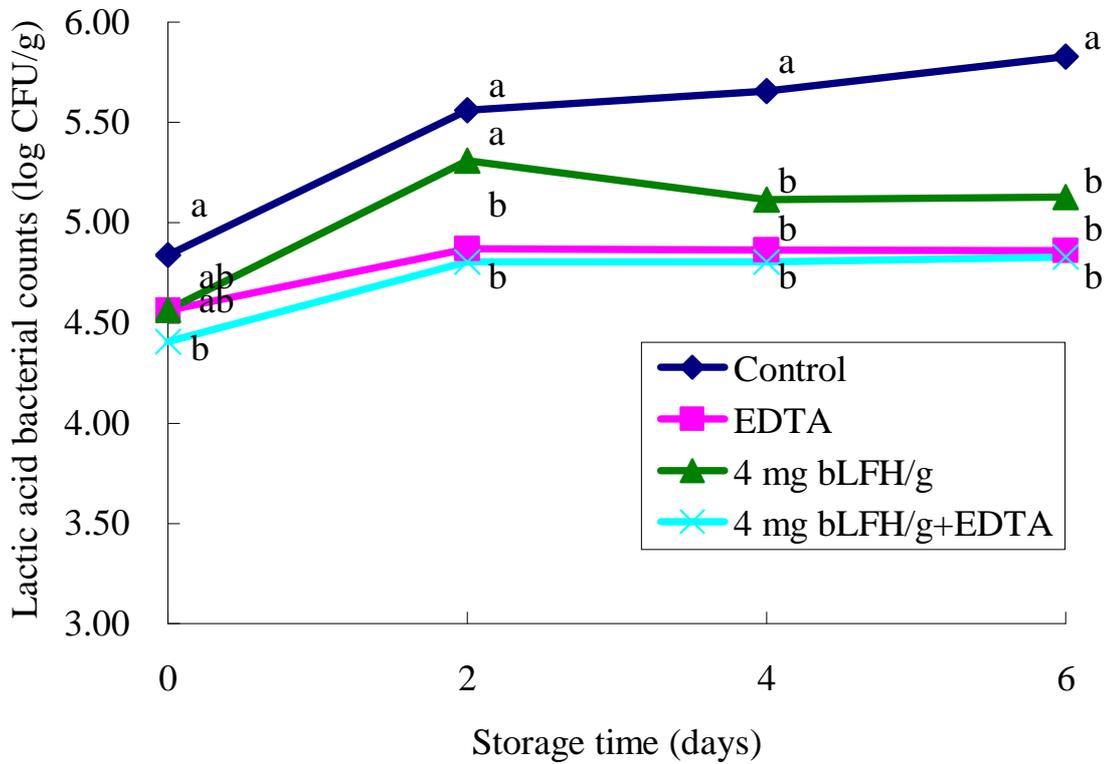
乳酸菌為無運動性且不產孢之革蘭氏陽性菌, 為耐氧性的厭氧菌 (aerotolerant anaerobes), 乳酸為發酵代謝的主要或唯一的產物。

圖三十八為添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉於貯藏期間 ( $4^{\circ}C$ ) 乳酸菌數的影響。於六天的冷藏期限內, 僅於冷藏的第 2 天控制組與 4 mg bLFH/g 組的乳酸菌數有顯著的上升 ( $p < 0.05$ ), 而冷藏期間各處理組的乳酸菌數皆低於控制組, 其中 EDTA 組之乳酸菌數無顯著的變化 ( $p > 0.05$ )。菌體生長需要多種金屬離

子，如鎂 (magnesium)、鐵 (iron) 等離子。鐵在細胞呼吸中擔任重要的角色，因為鐵是電子傳遞鏈中細胞色素與鐵硫蛋白的重要成分，故菌體需大量的鐵供其生長之用，然而，由於乳酸菌缺少吡啉 (pyrrole) 及細胞色素 (cytochrome)，所以在能量的獲得上，不會進行電子傳遞磷酸化作用 (electron transport phosphorylation)，而只能從受質階段的磷酸化作用 (substrate-level phosphorylation) 中獲得能量，即葡萄糖分解作用 (glycolysis) (謝，1995)，故鐵對於乳酸菌的生長情形影響不大。有文獻指出，乳酸菌生長所需的元素並不包含鐵 (Bruyneel *et al.*, 1989; Weinberg, 1997)，該特色有助於乳酸菌與環境中其他病原菌進行競爭 (Chung *et al.*, 1998)。於乳酸桿菌 (lactobacilli) 的生長培養基中添加鐵並不會影響其生長情形，而且沒有文獻指出乳酸菌中有鐵質運載體 (siderophores) 的存在 (Pandey *et al.*, 1994)。而鎂的作用是穩定核糖體、細胞膜以及核酸等，同時也是許多酵素作用所必須的元素，特別是和磷酸轉移有關的酵素，所以菌體生長需要大量的鎂 (謝，1995)。EDTA 為結構對稱穩定的含氮有機物，是一種常用的螯合劑，當 EDTA 螯合住環境中的金屬離子 (如鎂)，乳酸菌的生長可能因而受到抑制。又乳酸菌自葡萄糖分解作用而獲得能量的過程中，須以主動運輸的方式將葡萄糖送入菌體內，故當水解物中的陽離子抗菌片段 (含牛乳鐵蛋白素) 與乳酸菌的細胞膜作用，改變膜的通透

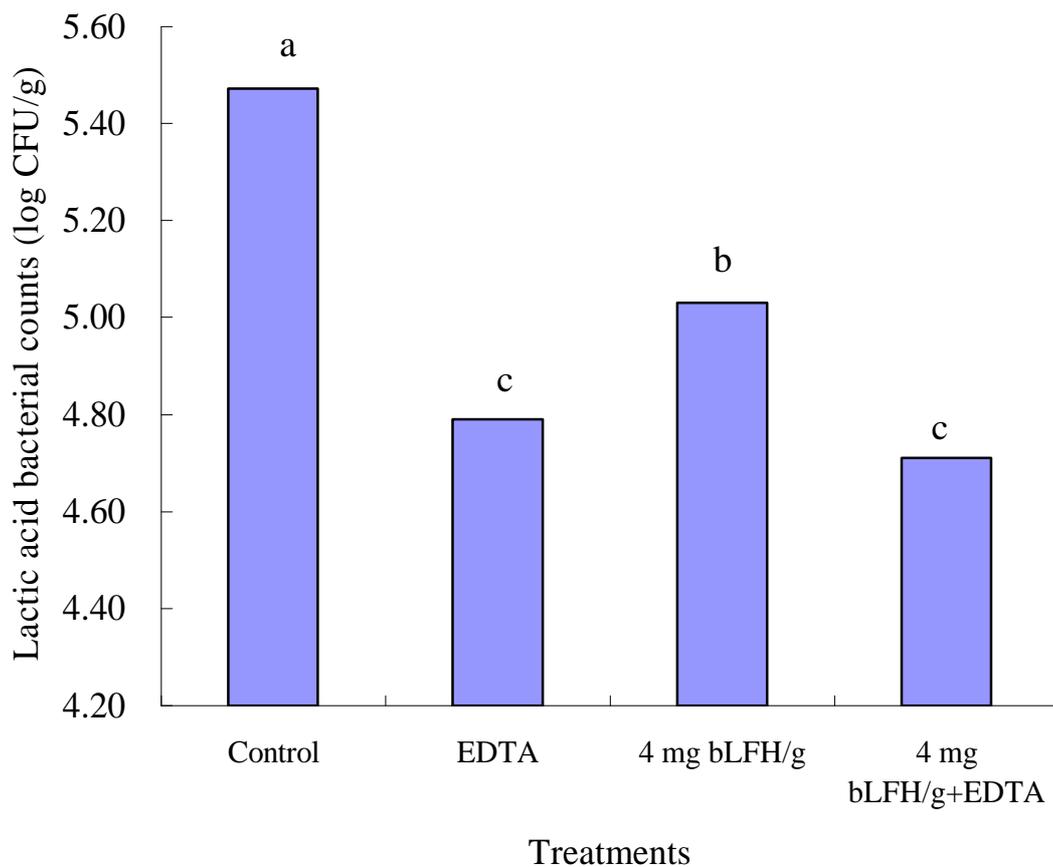
性，使微生物失去質子驅動力，無法進行主動運輸，乳酸菌可能會因無法進行葡萄糖分解作用以獲得能量，最終導致菌體死亡。

圖三十九為添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉乳酸菌數（各貯藏時間之平均值）的影響。整體而言，添加 250 ppm 的 EDTA 及 4 mg bLFH/g meat (2 倍最小抑菌濃度量) 於豬後腿絞肉中，可使乳酸菌數的生長情形分別減少 0.68 及 0.44 個對數值 (log CFU/mL)，但若合併添加水解物與 EDTA 則可減少 0.76 個對數值。結果顯示添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 至豬後腿絞肉，可明顯減緩乳酸菌數的生長情形 ( $p < 0.05$ )，但合併添加水解物與 EDTA 對乳酸菌而言則沒有表現出明顯的抗菌協同效果 ( $p > 0.05$ )。然而於冷藏的第 0 天，各處理組的乳酸菌數皆低於控制組，但是控制組與 4 mg bLFH/g 組及 EDTA 組的乳酸菌數並沒有顯著差異 ( $p > 0.05$ )，只與 4 mg bLFH/g+EDTA 組的乳酸菌數有顯著差異 ( $p < 0.05$ ) (圖三十八)，這表示同時添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 至豬後腿絞肉，僅於冷藏之初對肉中的乳酸菌表現出協同抗菌效果，可能原因為肉中的起始菌數。Jones *et al.* (1994) 指出牛乳鐵蛋白素的最小殺菌濃度 (minimal bactericidal concentration; MBC) 會隨著起始菌數的增加而上升。另外，肉中的大分子營養物質（如蛋白質）也可能是使協同作用無法持續的原因之一。



圖三十八、添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉於貯藏期間 (4°C) 乳酸菌數的影響。

Fig. 38. Effects of bovine lactoferrin hydrolysate (bLFH) and EDTA on lactic acid bacterial counts of ground hams during storage at 4°C for 6 days. <sup>a-b</sup>Means within a storage period having different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).



圖三十九、添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉乳酸菌數 (各貯藏時間之平均值) 的影響。

Fig. 39. Effects of bovine lactoferrin hydrolysate (bLFH) and EDTA on lactic acid bacterial counts (pooled data over storage time) of ground hams. <sup>a-c</sup>Bars with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

### (三) 大腸桿菌群

大腸桿菌群為革蘭氏陰性且不產孢之桿菌，可於 48 小時內發酵乳醣，主要寄生於哺乳動物的消化道內，包含四個腸內細菌科之菌屬，分別為 *Citrobacter*、*Enterobacter*、*Escherichia* 及 *Klebsiella*，雖無病原性，但是可以作為水及食品被糞便污染之指標細菌（方等，1999；陳和顏，1976）。

圖四十為添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉於貯藏期間 (4°C) 大腸桿菌群的影響。於六天的冷藏期限內，控制組與各處理組的大腸桿菌群數皆隨貯存時間的增加而有顯著的上升 ( $p < 0.05$ )，且各處理組的大腸桿菌群數皆低於控制組，但添加 4 mg bLFH/g meat 至豬後腿絞肉，於各冷藏天數下之大腸桿菌群數雖皆低於控制組，但二者之間無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。儘管從自然界中分離出的陽離子抗微生物胜肽 (Hancock *et al.*, 1999) 被證實可以有效的抗細菌、真菌、病毒與原生動物 (Martin *et al.*, 1995)，且有許多文獻指出牛乳鐵蛋白素可以抗多種革蘭氏陰性菌及陽性菌 (Bellamy *et al.*, 1992a, b; Yamauchi *et al.*, 1993; Dionysius *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 1998; Wakabayashi *et al.*, 1992)，然而，微生物也會對抗微生物胜肽產生抗性 (Groisman and Aspedon, 1997)。有研究指出大腸桿菌會藉由改變其外膜蛋白 C (outer membrane protein C; OmpC) (Siden and Boman,

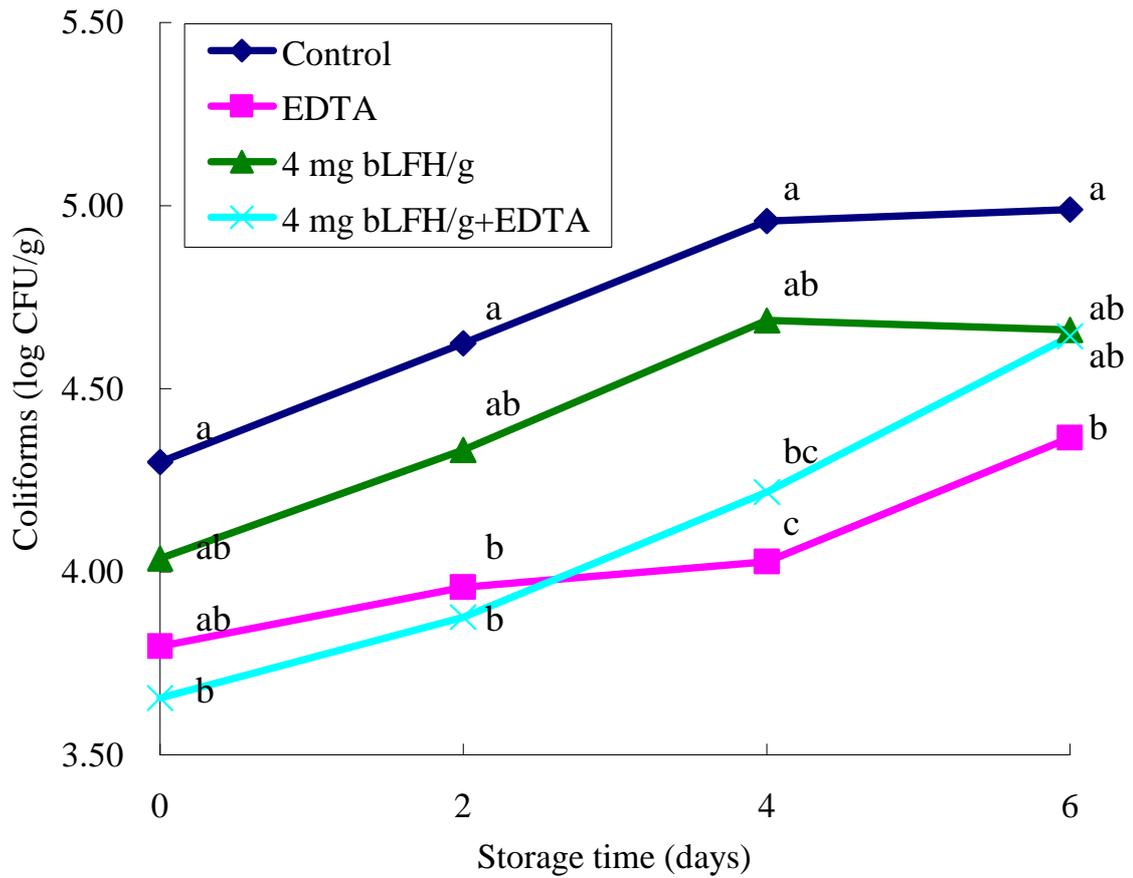
1983)，而增加暴露在抗微生物胜肽下的存活率。細菌本身的蛋白質分解酵素 (proteases) 也是讓細菌抵抗胜肽作用的機制之一 (Juretic *et al.*, 1989)，而大腸桿菌的外膜蛋白 T (OmpT) (Stumpe *et al.*, 1998) 已經被證實為蛋白質分解酵素，且細菌能藉此酵素對胜肽產生抗性。另一方面，肉中的大分子營養物質 (如蛋白質) 也可能會影響胜肽與菌體表面接觸，因而影響水解物的抗菌效果。

添加 250 ppm EDTA 至豬後腿絞肉，於 4 天的冷藏期間，大腸桿菌群數無顯著上升 ( $p > 0.05$ )，且除了冷藏的第 0 天外，其餘冷藏天數下的大腸桿菌群數皆明顯低於控制組 ( $p < 0.05$ ) (圖四十)。EDTA 會造成革蘭氏陰性菌脂多醣體的釋放，並改變菌體外膜的通透性，其作用機制如下：EDTA 會螯合存在於脂多醣體之間或是脂多醣體與磷脂質之間的二價陽離子，使帶負電的分子 (如脂多醣體) 之間產生排斥作用。磷脂質與脂多醣體的脂質 A 之間的疏水性作用力能夠穩定菌體的外膜，Duckworth *et al.* (1974) 指出經 EDTA 處理後的大腸桿菌，其磷脂酶 A (phospholipase A) 會被活化。磷脂酶 A 能將菌體外膜上的磷脂質去乙酰化，而降低磷脂質與脂多醣體的脂質 A 之間的疏水性作用力，因此造成脂多醣體的釋出，及/或導致菌體對放線菌素 (actinomycin) 更敏感。又鐵為微生物生長所需因子之一 (王等，1998)，而 EDTA 以螯合三價鐵的能力最強，故微生物會因缺鐵而無

法生長。

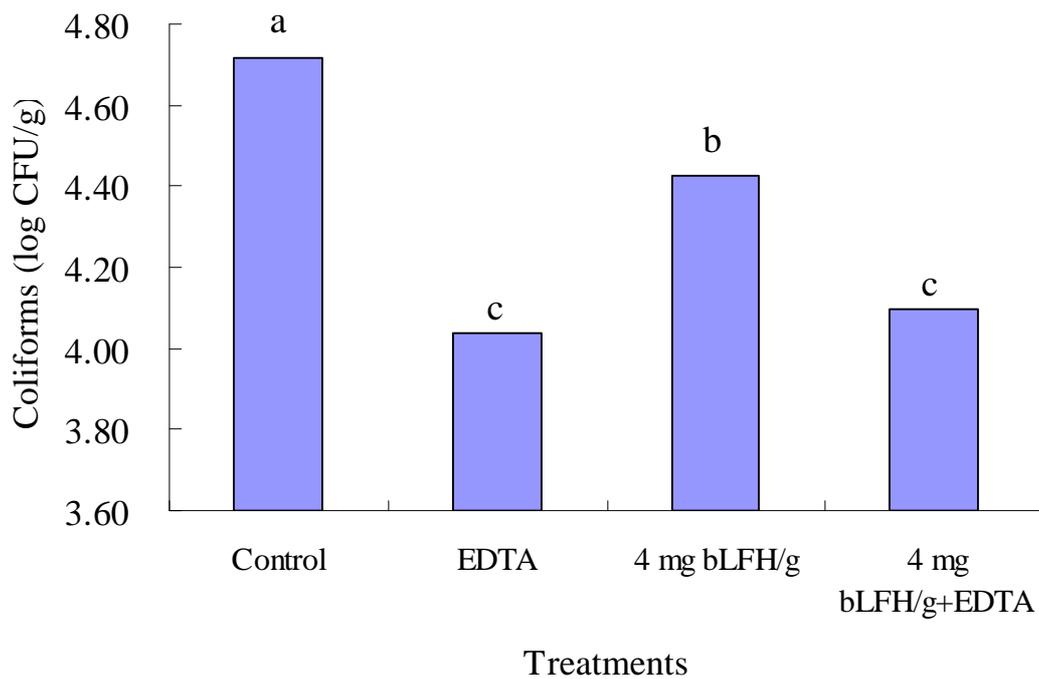
於冷藏的第 0 天，各處理組的大腸桿菌群數皆低於控制組，但是控制組與 4 mg bLFH/g 組及 EDTA 組的大腸桿菌群數並沒有顯著差異 ( $p > 0.05$ )，只與 4 mg bLFH/g+EDTA 組的大腸桿菌群數有顯著差異 ( $p < 0.05$ )，然而同時添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 至豬後腿絞肉，僅於冷藏之初對肉中的大腸桿菌群表現出協同抗菌效果，可能原因為肉中的起始菌數。有研究指出牛乳鐵蛋白素的最小殺菌濃度 (minimal bactericidal concentration; MBC) 會隨著起始菌數的增加而上升 (Jones *et al.*, 1994)。另外，肉中的大分子營養物質 (如蛋白質) 也可能是使協同作用無法持續的原因之一。

圖四十一為添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉 (各貯藏時間之平均值) 的影響。整體而言，添加 250 ppm 的 EDTA 及 4 mg bLFH/g meat 於豬後腿絞肉中，可使大腸桿菌群的生長情形分別減少 0.56 及 0.24 個對數值 (log CFU/mL)，但若合併添加水解物與 EDTA 則可減少 0.64 個對數值。結果顯示添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 至豬後腿絞肉，可明顯減緩大腸桿菌群的生長情形 ( $p < 0.05$ )，但合併添加水解物與 EDTA 對大腸桿菌群而言則沒有表現出明顯的抗菌協同效果 ( $p > 0.05$ )。



圖四十、添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉於貯藏期間 (4°C) 大腸桿菌群數的影響。

Fig. 40. Effects of bovine lactoferrin hydrolysate (bLFH) and EDTA on coliforms of ground hams during storage at 4°C for 6 days. <sup>a-c</sup>Means within a storage period having different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).



圖四十一、添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉大腸桿菌群數（各貯藏時間之平均值）的影響。

Fig. 41. Effects of bovine lactoferrin hydrolysate (bLFH) and EDTA on coliforms (pooled data over storage time) of ground hams. <sup>a-c</sup>Bars with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

牛乳鐵蛋白水解物中的陽離子抗微生物胜肽 (含牛乳鐵蛋白素) 會與革蘭氏陰性菌外膜上帶負電的的脂多醣體給吸引並附著到菌體表面，再插入細胞膜中以改變膜的通透性。細胞膜是菌體主要產生與維持能量的胞器，能夠合成腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate; ATP) 與巨分子 (macromolecules) 以及維持膜內外之質子梯度 (transmembrane proton gradient) (Cronan *et al.*, 1987)。儘管質子很小，但仍無法自由穿透細胞膜，一旦細胞膜的通透性被破壞，細胞膜電位 (membrane potential) 降低，微生物因此失去了質子驅動力質子驅動力，無法推動 ATP 高能磷酸鍵的合成外，主動運輸與鞭毛的運動也無法繼續進行，細胞內的酸鹼值亦產生變化，最終導致菌體死亡。

本次實驗結果顯示，添加 250 ppm 的 EDTA 及/或 4 mg bLFH/g meat 於豬後腿絞肉中，皆可明顯減緩大腸桿菌群的生長情形 ( $p < 0.05$ )，但添加水解物的抗菌效果明顯較添加 EDTA 差 ( $p < 0.05$ ) (圖四十一)，可能原因為兩者的抗菌機制不同，且大腸桿菌群中可能有部分的菌株會藉由上述的機制對水解物中的陽離子抗微生物胜肽 (包括牛乳鐵蛋白素) 產生抗性，而肉中的大分子營養物質也可能會阻斷胜肽與菌體表面接觸，進而影響水解物的抗菌效果。

有文獻指出，大腸桿菌經 EDTA 處理後會釋出脂多醣體與其他

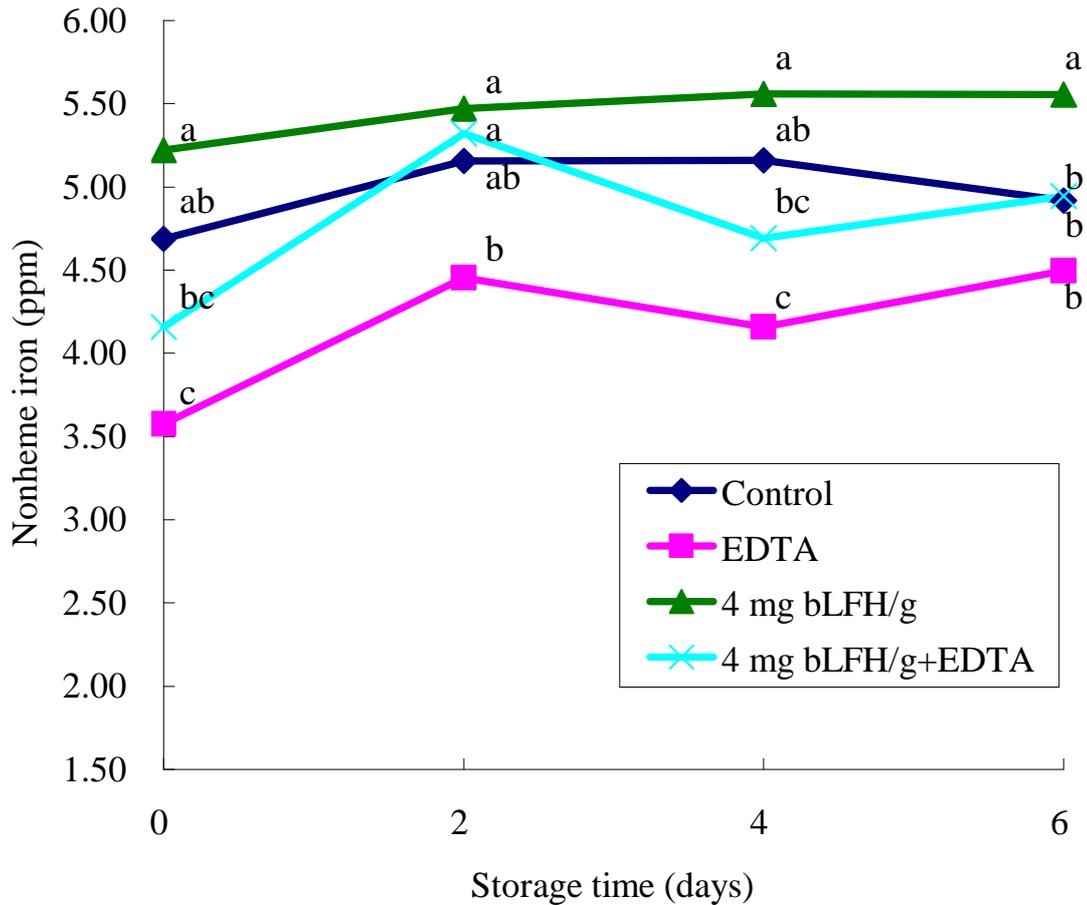
外膜的組成份，而原本對抗生素具有耐受性的革蘭氏陰性菌，經 EDTA 處理後也會增加對放線菌素 D (actinomycin D) 的敏感性 (Leive, 1965; 1968)。革蘭氏陰性菌的外膜被破壞後，細菌轉弱而增加疏水性分子的通透性 (Pelletier *et al.*, 1994；王等，1998)，水解物中的抗微生物肽因此進入菌體內部，影響 DNA、RNA 和蛋白質等巨分子的合成與作用，達到抑制菌體生長的效果。

## 六、非血基質鐵

圖四十二為添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉於貯藏期間 (4°C) 非血基質鐵的影響。於六天的冷藏期限內，控制組與 4 mg bLFH/g 組的非血基質鐵含量並不會隨貯存時間的增加而有顯著改變 ( $p > 0.05$ )，但是 EDTA 組與 4 mg bLFH/g+EDTA 組的非血基質鐵含量則會隨貯存時間的增加而有顯著的上升 ( $p < 0.05$ )。有文獻指出冷藏 (4°C) 絞碎牛肉的半膜肌 (*semimembraneous muscle*) 於六天的貯存期限內，非血基質鐵的含量並沒有改變 (Rhee *et al.*, 1989)，且肌肉的種類和型式皆不會改變非血基質鐵於貯存期間的含量 (Rhee *et al.*, 1996)。另有文獻指出血基質的 porphyrin ring 能夠被氧化 (Erdman and Watts, 1957; Tarladgis, 1962)，當 porphyrin ring 氧化斷裂後，隨即釋放出血基質鐵 (Schricker and Miller, 1983)，非血基質鐵的

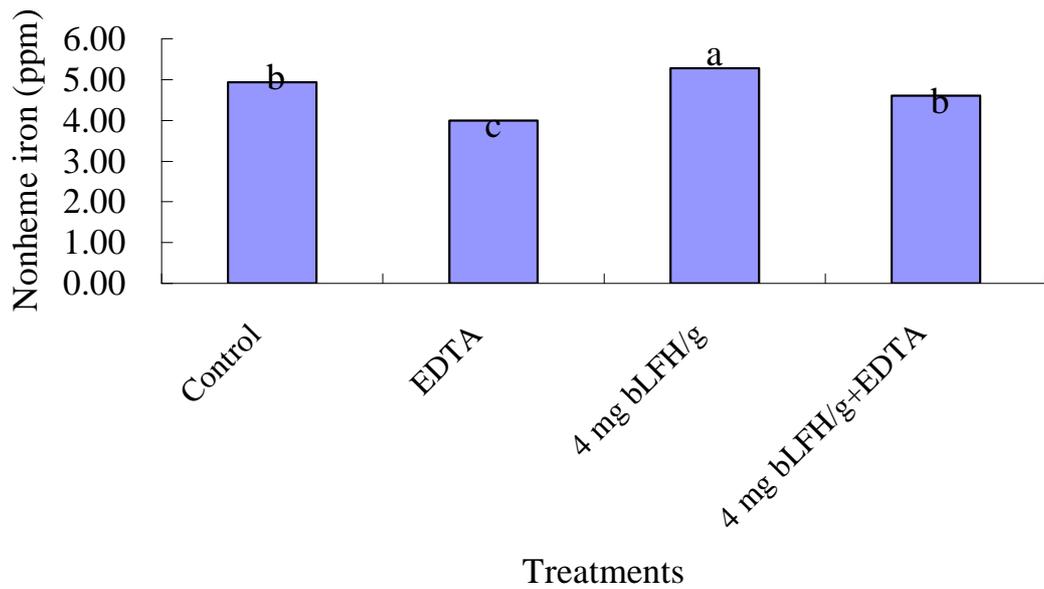
含量因而增加。Miller *et al.* (1994) 也發現冷藏 (4°C) 豬骨直肌 (*rectus femoris*) 與背最長肌 (*longissimus dorsi*) 於 12 天的貯存期限內，非血基質鐵的含量會隨貯存時間的增加而持續上升。

圖四十三為添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉非血基質鐵 (各貯藏時間之平均值) 的影響。研究結果發現 4 mg bLFH/g 組的非血基質鐵含量明顯高於控制組 ( $p < 0.05$ )，而 EDTA 組的非血基質鐵含量則明顯低於控制組 ( $p < 0.05$ )，至於 4 mg bLFH/g+EDTA 組則與控制組無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。添加水解物至豬後腿絞肉，會增加肉中非血基質鐵含量的可能原因為本次實驗所使用之牛乳鐵蛋白並非鐵飽和度低於 5% 之 apolactoferrin，而是鐵飽和度 ( $\leq 8\%$ ) 較高的牛乳鐵蛋白。乳鐵蛋白螯合鐵的能力會受到 pH 值的影響，有報告指出乳鐵蛋白在  $\text{pH} > 7$  時，幾乎不會將鐵釋放出來，當漸漸調降 pH 值至 5.5 時，則約有 80% 的鐵會被釋放出來 (Feng *et al.*, 1995)，而在  $\text{pH} < 3.5$  時，乳鐵蛋白會非常快速的將鐵釋放出來，此時乳鐵蛋白的構形為展開狀 (Abdallah *et al.*, 2000)。在製備牛乳鐵蛋白水解物時，會先將牛乳鐵蛋白溶液的酸鹼值調整至 2.5，可能在該過程中，牛乳鐵蛋白會將鐵釋放出來。加上牛乳鐵蛋白經胃蛋白酶 (pepsin) 水解後，會喪失鐵螯合能力，故當水解液的酸鹼值被調回中性時，被釋出的鐵仍保持游離的狀態。



圖四十二、添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉於貯藏期間 (4°C) 非血基質鐵的影響。

Fig. 42. Effects of bovine lactoferrin hydrolysate (bLFH) and EDTA on nonheme iron of ground hams during storage at 4°C for 6 days. <sup>a-c</sup>Means within a storage period having different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).



圖四十三、 添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉非血基質鐵 (各貯藏時間之平均值) 的影響。

Fig. 43. Effects of bovine lactoferrin hydrolysate (bLFH) and EDTA on nonheme iron (pooled data over storage time) of ground hams. <sup>a-c</sup>Bars with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

### 第三部分 牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對貢丸抗菌性之探討

有文獻指出溫度、酸鹼值、水活性、起始菌數 (microbial load)、離子濃度以及食物的組成分皆會影響到乳鐵蛋白素的抗菌表現 (Jones *et al.*, 1994; Wakabayashi *et al.*, 1992)。隨著溫度的下降，菌體細胞膜上脂肪酸乙醯鏈的雙鍵數會增加，而雙鍵會讓乙醯鏈糾纏在一起，降低細胞膜上磷脂質的穩定度，因此，牛乳鐵蛋白素在低溫下有較好的抗菌表現 (Vorland *et al.*, 1999)。本實驗所選用的測試溫度 (7°C) 是財團法人 CAS 優良農產品發展協會公布之中式乳化型肉品 (Chinese emulsion type meat) 品質規格及標示規定中冷藏溫度的上限，由於進行預備實驗時發現，煮熟 (中心溫度達 72°C 以上) 之加工肉製品 (貢丸) 於冷藏 (4°C) 期間不易腐敗，因此不以 4°C 作為本次實驗之保存條件，改以用電量較 4°C 低的 7°C 來進行貯藏實驗。

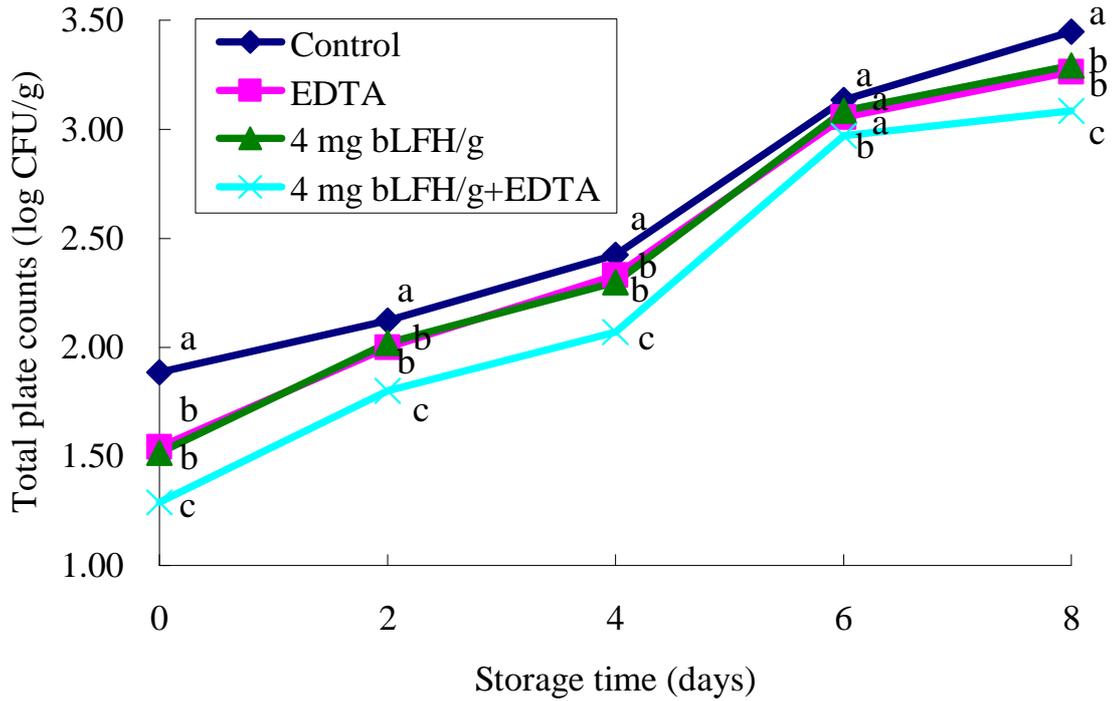
圖四十四為添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對貢丸於貯藏期間 (7°C) 總生菌數的影響。於八天的冷藏期限內，控制組與各處理組的總生菌數皆隨貯存時間的增加而有顯著的上升 ( $p < 0.05$ )。除了於冷藏的第 6 天，各處理組的總生菌數皆明顯低於控制組 ( $p < 0.05$ )，且於八天的冷藏期限內，EDTA 組與 4 mg bLFH/g 組的總生菌數並無顯著差異 ( $p > 0.05$ )，但是 4 mg bLFH/g+EDTA 組的總生菌數則明顯低

於控制組與另外兩個處理組 ( $p < 0.05$ )，這表示牛乳鐵蛋白水解物具有耐熱性，於  $80^{\circ}\text{C}$  下水煮 15 分鐘後，仍具有抗菌效果，且同時添加水解物及 EDTA 至貢丸中，可於冷藏期間對總生菌數表現出協同抗菌效果。

圖四十五為添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對貢丸總生菌數 (各貯藏時間之平均值) 的影響。整體而言，添加牛乳鐵蛋白水解物或 EDTA 於貢丸中，皆可使總生菌數的生長情形減少 0.16 個對數值 ( $\log \text{CFU/mL}$ )，但若合併添加水解物與 EDTA 則可減少 0.36 個對數值。結果顯示添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 至豬後腿絞肉，可明顯減緩總生菌數的生長情形 ( $p < 0.05$ )，但 EDTA 組與 4 mg bLFH/g 組之間沒有顯著差異 ( $p > 0.05$ )，然而合併使用水解物與 EDTA 則明顯表現出協同抗菌作用 ( $p < 0.05$ )。

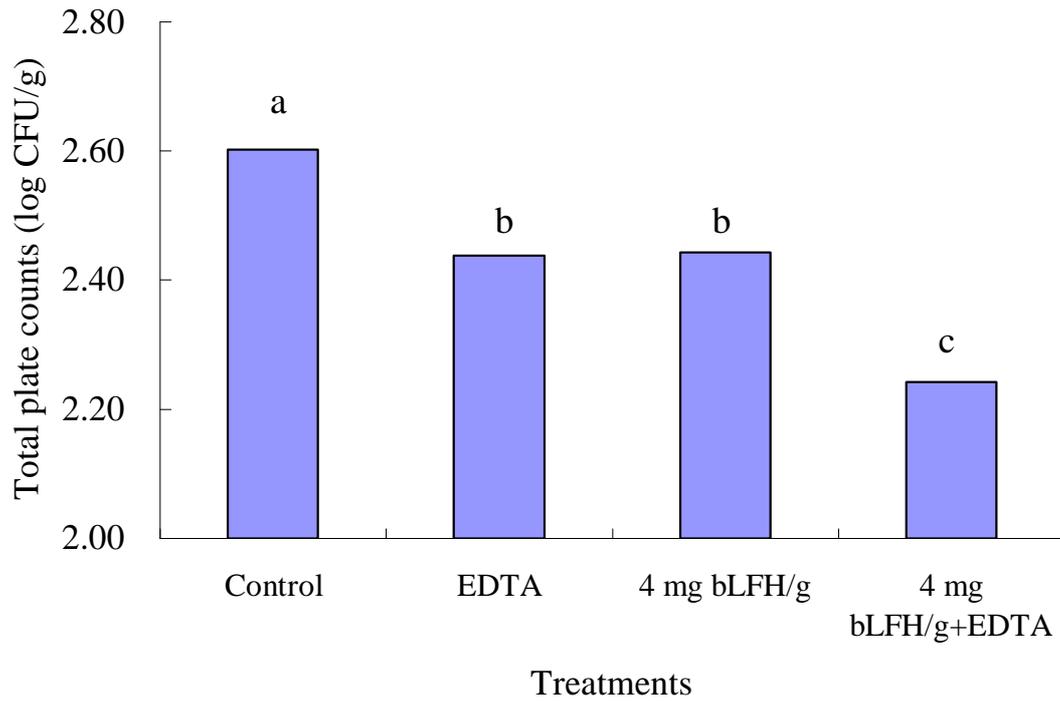
有研究指出單價及二價陽離子會降低乳鐵蛋白素的抑菌表現，像是 10-100 mM 的氯化鈉 (sodium chloride; NaCl) 或氯化鉀 (potassium chloride; KCl) (Dionysius *et al.*, 1997)、100 mM 的氯化銨 (ammonium chloride;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 及 1-5 mM 的氯化鎂 (magnesium chloride;  $\text{MgCl}_2$ ) 或氯化鈣 (calcium chloride;  $\text{CaCl}_2$ ) (Wakabayashi *et al.*, 1992)。Chantaysakorn *et al.* (2000) 添加牛乳鐵蛋白之胃蛋白酶水

解物到胡蘿蔔汁中，發現水解物的濃度在 10 mg/mL 以下時對 *E. coli* 沒有抗菌效果；若將胡蘿蔔汁先以膜過濾，去除 500 Da 以上的分子，再透析的方式去除分子量在 12,000-14,000 以下的分子，發現將水解物添加在透析液中，並於 23°C 下培養 24 小時後，可對 *E. coli* 表現出殺菌效果。證實食品中會影響水解物抗菌表現的最主要成分為小分子物質，且極有可能為鹽類中的金屬離子。故本實驗同時添加水解物與 EDTA 至貢丸中，希望藉由 EDTA 來螯合肉中的游離金屬離子，以提升水解物中所含陽離子抗微生物肽的抗菌表現，結果發現兩物質間產生的協同效果顯著 ( $p < 0.05$ )，此結果之所以不同於第二部分的總生菌數測定結果，可能原因為貢丸與豬後腿絞肉之起始菌數不同，以及貢丸中含有高於豬後腿絞肉之金屬螯合劑，即貢丸製作過程當中所添加之多磷酸鈉 (Sodium triphosphate)。有研究指出牛乳鐵蛋白素的最小殺菌濃度 (minimal bactericidal concentration; MBC) 會受到起始菌數的影響 (Jones *et al.*, 1994)，而本次實驗結果顯示，貢丸與豬後腿絞肉的起始菌數分別為 1.89 與 6.11 個對數值。



圖四十四、添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對貢丸於貯藏期 (7°C) 總生菌數的影響。

Fig. 44. Effects of bovine lactoferrin hydrolysate (bLFH) and EDTA on total plate counts of meat balls during storage at 7°C for 6 days. <sup>a-c</sup>Means within a storage period having different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).



圖四十五、添加牛乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對貢丸總生菌數 (各貯藏時間之平均值) 的影響。

Fig. 45. Effects of bovine lactoferrin hydrolysate (bLFH) and EDTA on total plate counts (pooled data over storage time) of meat balls. <sup>a-c</sup>Bars with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

# 伍、結論

## 結論

本實驗在分析乳鐵蛋白水解液的耐熱性，發現乳鐵蛋白水解液於 100°C 加熱後，其抑菌的效果會隨著加熱的時間增加而下降，且進一步純化分析乳鐵蛋白水解液上澄液中所含抗菌勝肽的濃度，發現隨著加熱時間上升，乳鐵蛋白水解液上澄液中的抗菌勝肽濃度相對的減少，在加熱 5 及 10 分鐘後，抗菌勝肽分別為原始濃度之 58.5 及 40.1 %，由此可知，乳鐵蛋白水解液在加熱後所形成的凝集沉澱現象，會影響乳鐵蛋白水解液的抗菌效果，且不同加熱時間，對於所含抗菌勝肽濃度亦有不同的影響。

本試驗在探討牛乳鐵蛋白水解物 (bLFH) 及/或 EDTA 對豬後腿絞肉抗氧化性及抗菌性之影響。在第一部分的抗菌試驗中，找到牛乳鐵蛋白及其水解物對 *S. aureus* ATCC 9144 與 *P. aeruginosa* ATCC 14207 兩株菌的最小抑菌濃度，並發現 *P. aeruginosa* 對這二個抗菌物質較具耐受性。透過蛋白質電泳分析證實牛乳鐵蛋白經胃蛋白酶水解 4 小時後，能被完全水解 (水解率為 6.88%) 且主要會產生分子量在 3.496 kD-6.512 kD 之間的勝肽。在第二部份的試驗中，添加 250 ppm EDTA 及/或 4 mg bLFH/g meat 對冷藏豬後腿絞肉的水分、粗脂肪及 pH 值沒有顯著影響，但能抑制總生菌數、乳酸菌數及大腸桿菌群數，其中對微生物的抑菌表現以合併使用 EDTA 與水解物最佳，兩者間具

有協同抗菌效果，單獨添加水解物的抗菌表現最差，且水解物會促進豬後腿絞肉的脂質氧化，可能原因為牛乳鐵蛋白經水解後會釋放出鐵離子，故添加水解物至豬後腿絞肉中會增加肉的非血基質鐵含量，使於冷藏期間產生促氧化現象，但若同時添加 EDTA 則可改善此現象。在第三部份的試驗中，添加 250 ppm EDTA 及/或 4 mg bLFH/g meat 能抑制貢丸總生菌數的生長，證實牛乳鐵蛋白水解物能耐 80°C、15 分鐘的加熱處理，且 EDTA 與水解物之間的協同抗菌表現明顯。因此，水解物確實可以應用於生鮮或熟肉製品上，抑制腐敗菌的生長，但須考慮到脂質氧化與成本問題，建議合併使用金屬螯合劑（如 EDTA 等），除能防止脂質氧化外，亦能產生協同抗菌效果，如此，添加牛乳鐵蛋白水解物至肉品就有其價值。

# 陸、參考文獻

## 參考文獻

中國國家標準，CNS 108960 (N 6186)。1991。食品微生物之檢驗法。  
經濟部中央標準局印行，台北。

曹李宏。1999。牛乳鐵蛋白對大腸桿菌與幽門螺旋菌抗菌作用之探討。碩士論文。國立中興大學獸醫微生物學研究所。

Ahmed, A. A., Moustafa, M. K., Marth, E. H. (1983) Growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* in whey from the manufacture of Domiati Cheese. *J. Food Protect.* 46: 235-237.

Ahn, D. U., Olson, D. G., Jo, C., Chen, X., Wu, C. and Lee, J. I. (1998a) Effect of muscle type, packing and irradiation on lipid oxidation, volatile production and color in raw pork patties. *Meat Sci.* 49: 27-39.

Ahn, D. U., Olson, D. G., Lee, J. I., Jo, C., Chen, X. and Wu, C. (1998b) Packing and irradiation effects on lipid oxidation and volatiles in pork patties. *J. Food Sci.* 63: 15-19.

Anderson, B. F., Baker, H. M., Norris, G. E., Rice, D. W., Baker, E. N. 1989. Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 209: 711-734.

A.O.A.C. (1984) Official Method of Analysis, 14<sup>th</sup> ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington. 152-159.

A.O.A.C. (1991) Official Method of Analysis, 16<sup>th</sup> ed., Virginia, USA: Association of Official Analytical Chemists International.

Arnold, R. R., M. Brewer, and J. J. Gautier. 1980. Bactericidal activity of human lactoferrin: Sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect. Immun.* 28:893-898.

Balmer, S. E., Scott, P. H. and Whaton, B. A. (1989) Diet and fecal flora

in the new-born: lactoferrin. *Arch. Dis. Child.* 64: 1685-1690.

Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K. and Tomita, M. 1992. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *BBA* 1121:130-136.

Bellamy, W., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Takase, M., Takakura, N., Simamura, S. *et al.* 1994. Antifungal properties of lactoferricin B, a peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Lett. Appl. Microbiol.* **18**: 230–233.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Brock, J. 1995. Lactoferrin: a multifunctional immunoregulatory protein. *Immunol. Today.* 16, 417-419.

Chapple, D. S., Mason, D. J., Joannou, C. L., Odell, E. W., Gant, V. and Evans, R. W. 1998. Structure-function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against *Escherichia coli* serotype O111. *Infect. Immun.* 66:2434–2440.

Chapple, D. S., Joannou, C. L., Mason, D. J., Shergill, J. K., Odell, E. W., Gant, V. and Evans, R. W. 1998. A helical region on human lactoferrin—its role in antibacterial pathogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 443:215–220.

Chapple, D. S., Mason, D. J., Joannou, C. L., Odell, E. W., Gant, V. and Evans, R. W. 1998. Structure-function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against *Escherichia coli* serotype O111. *Infect. Immun.* 66: 2434–2440.

Chapple, D. S., Hussain, R., Joannou, C. L., Hancock, R. E. W., Odell, E., Evans, R. W. *et al.* 2004. Structure and association of human lactoferrin peptides with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 2190–2198.

Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H. and Catignani, G. L. (1983) Spectrophotometric assay using *o*-Phthaldialdehyde for determination of

proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66: 1219-1227.

Chen, P. W., Ho, S. P., Shyu, C. L. and Mao, F. C. (2004) Effects of bovine lactoferrin hydrolysate on the in vitro antimicrobial susceptibility of *Escherchia coli* strains isolated from baby pigs. *American Journal of Veterinary Reseach.* 65(2): 131-137.

Cirioni, O., Giacometi, A., Barchiesi, F. and Scalise, G. (2000) Inhibition of growth of *Pneumocystis carinii* by lactoferrins alone and in Antimicrob. *Chemother.*46: 577-582.

Cochran, M., Coates, J. and Neoh, S. (1984) The competitive equilibrium between aluminium ferric ions for the binding sites of transferrin. *FEBS Lett.* 176: 129-132.

Compton, S. J. and Jones, C. G. (1986) Mechanism of dye response and interferences in the Bradford protein assay. *Bio-Radiations* 61: 5.

Crouch, S. P. M., Slater, K. J., Fletcher, J. 1992. Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. *Blood*, 80: 235-240.

Ellison, R. T., Giehl, T. J., Laforce, F. M. 1988. Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect. Immun.*, 56: 2744-2781.

Ellison III, R. T., LaForce, F. M., Giehl, T. J., Boose, D. S., Dumm, B. E. 1990. Lactoferrin and transferrin damage of the Gram-negative outer membrane is modulated by  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ . *J. Gen. Microbiol.* 136, 1437-1446.

Epand, R. M. and Vogel, H.J. 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanism of action. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 11-28.

Feng, M., Der Does, L. V. and Bantjes, A. (1995) Preparation of apolactoferrin with a very low iron saturation. *J. Dairy Sci.* 78:2352-2357.

Fujihara, T. and Hayashi, K. (1995) lactoferrin inhibits herpes simplex virus type-1 (HSV-1) infection to mouse cornea. *Arch. Virol.* 140: 1469-1472.

Groves, M. L. (1960) The isolation of a red protein from milk. *J. Am. Chem. Soc.* 82: 3345-3350.

Hancock R. E. W. and Chapple D. S. 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43(6): 1317-1323.

Harmsen, M. C., Swart, P. J., de Bethune, M. P., Pauwels, R., de Clercq, E., The, T. H. and Meijer, D. K. (1995) Antiviral effects of plasma and milk protein: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro. *J. Infect. Dis.* 172: 380-388.

He, J. and Furmanski, P. 1995. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature* 373: 721-724.

Heather, M. B., B. F. Anderson, R. D. Kidd, S. C. Shewry, and E. N. Baker. 2000. Lactoferrin three-dimensional structure: a framework for interpreting function. *Lactoferrin : Structure, Function and Application.* p3-15.

Hennart, P. F., Brasseur, D. J., Delogne-Desnoeck, J. B., Dramaix, M. M. and Robyn, C. E. (1991) Lysozyme, Lactoferrin, and secretory immunoglobulin A content in breast milk: influence of duration of lactation, nutrition status, prolactin status, and parity of mother. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 32-39.

Hoek, K. S., Milne, J. M., Grieve, P. A., Dionysius, D. A. and Smith, R. 1997. Antibacterial activity of bovine lactoferrin-derived peptides. *Antimicro. Agents Chemother.* 41: 54-59.

Hof, W. V., Veerman, E. C. I., Helmerhorst, E. J., Amerongen, A. V. N., 2001. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol. Chem.* 382: 597-619.

Iyer, S. and Lonnderal, B. 1993. Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. *Eur. J. Clin. Nutr.* 47: 232-241.

Jenssen, H., Andersen, J. H., Uhlin-Hansen, L., Gutteberg, T. J. and Rekdal, Ø. 2004. Anti-HSV activity of lactoferricin analogues is only partly related to their affinity for heparan sulfate. *Antiviral Res.* **61**: 101-109.

- Kang, J. H., Lee, M. K., Kim, K. L., Hahm, K.S. 1996. Structure-biological activity relationships of 11-residue highly basic peptide segment of bovine lactoferrin. *Int. J. Peptide Prot. Res.* **48**: 357–363.
- Kuipers, M. E., Vries, H. G., Eikelboom, M. C., Meijer, D. K. and Swart, P. J. 1999. Synergistic fungistatic effects of lactoferrin in combination with antifungal drugs against clinical *Candida* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43(11): 2635-2641.
- Kullberg, B. J., Netea, M. G., Vonk, A. G. and van der Meer, J. W. 1999. Modulation of neutrophil functions in host defense against disseminated *Candida albicans* infection in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **26**: 299–307.
- Kuwata, H., Yip, T. T., Tomita, M. and Hutchens, T. W. 1998. Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1429: 129-141.
- Levay, P. F. and Viljoen, M. 1995. Lactoferrin : a general review. *Haematologica* 80: 252-267.
- Masson, P. L. and Heremans, J. F. (1971) Lactoferrin in milk from different species. *Comp. Biochem. Physiol.* 39B: 119-129.
- Masson, P. L., Heremans, J. F. and Dive, C. (1966) An iron-binding protein common to many external secretions. *Clin. Chem. Acta.* 13: 735-739.
- Matsuzaki, K. 1999. Why and how are peptide±lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 1-10.
- Metz-Boutigue, M. H., Jolles, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J. and Jolles, P. 1984. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparison with other transferrins. *Eur. J. Biochem.* 145, 659-676.
- Naidu, A. S. (2002) Activated lactoferrin-a new approach to meat safety. *Food Technology.* 56(3): 40-45.

Nonnecke, B. J. and Smith, K. L. (1984) Inhibition of mastitic bacteria by bovine milk apo-lactoferrin evaluated by *in vitro* microassay of bacterial growth. *J. Dairy Sci.* 67: 606-613.

Ockeman, H. W. (1985) Quality control of post-mortem muscle tissue. Dept. of Animal Science. The Ohio State University.

Omata, Y., Satake, M., Maeda, R., Saito, A., Shimazaki, K., Yamauchi, K., Uzaka, Y., Tanbe, S., Sarashina, T. and Mikami, T. (2001) Reduction of the infectivity of *Toxoplasma gondii* and *Eimeria stiedai* sporozoites by treatment with bovine lactoferrin. *J. Vet. Med. Sci.* 63: 187-190.

Oren, Z., Lerman, J. C., Gudmundsson, G. H., Agerberth, B. and Shai, Y. 1999. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its noncell- selective activity. *Biochem. J.* 341:501–513.

Pakdaman, R., Petitjean, M. and Chahine, J.-M. El. H. (1998) Transferrins-a mechanism for iron uptake by lactoferrin. *Eur J. Biochem.* 254(1): 144-153.

Palma, C., Cassone, A., Serbousek, D., Pearson, C. A. and Djeu, J. Y. (1992) Lactoferrin release and interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor production by human polymorphonuclear cells stimulated by various lipopolysaccharides: relationship to growth inhibition of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 60: 4606-4611.

Payne, K. D., Davidson, P. M., Oliver, S. P. and Christen, G. L. (1990) Influence of bovine lactoferrin on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 53: 468-472.

Payne, K. D., Oliver, S. P. and Davidson, P. M. (1994) Comparison of EDTA and apo-lactoferrin with lysozyme on the growth of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *J. Food Prot.* 57: 62-65.

Rainard, P. 1986. Bacteriostatic activity of bovine milk lactoferrin against mastitic bacteria. *Vet. Microbiol.*, 11: 387-392.

Recio, I., Visser, S. 1998. Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin in situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane. *J. Chromatogr. A* 831:191-201.

Reiter, B. (1978) Review of the progress of dairy science: antimicrobial systems in milk. *J. Dairy Res.* 45: 131-147.

Reisner, A. H., Nemes, P. and Bucholtz, C. (1975) The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 64 (2): 509-516.

Rhee, K. S., and Ziprin, Y. A. (1987) Modification of the schricker nonheme iron method to minimize pigment effects for red meats. *J. Food Sci.* 52(5): 1174-1175.

Sedmack, J. J. and Grossberg, S. E. (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. *Anal. Biochem.* 79: 544-552.

Shan-Ming, Y., Kanamaru, Y., Ikeda, S., Keneko, T., Kuwata, T., Nagaoka, S., Shimizu, M. and Sachdev, G. P. 2000. Identification of two molecular species in human milk-derived lactoferrin. In *Lactoferrin: Structure, Function and Application*. P. 17-25.

Shimaazki, K. I., Oota, K., Nitta, K. and Ke, Y. (1994) Comparative study of the iron-binding strengths of equine, bovine and human lactoferrins. *J. Dairy Res.* 61: 563-566.

Shimazaki, K., Tazume, T., Uji, K., Tanaka, M., Kumura, H., Mikawa., K. and Shimo-oka, T. 1998. Properties of a heparin-binding peptide derived from bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.* 81:2841-2849.

Steijns, J. M. and A. C. M. Hooijdonk. 2000. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *Br. J. Nutr.* 1: 11-17.

Strøm, M. B., Rekdal, Ø., Svendsen, J. S. 2000. Antibacterial activity of 15-residue lactoferricin derivatives. *J. Peptide Res.* 56: 265–274.

Strøm M. B., Rekdal Ø. and Svendsen J. S. 2002. The effects of charge and lipophilicity on the antibacterial activity of undecapeptides derived from bovine lactoferricin. *J. Pept. Sci.* 7: 36–43.

Strøm M. B., Haug B. E., Rekdal Ø., Skar M. L., Stense W. et al. 2002. Important structural features of 15-residue lactoferrin derivatives and

methods for improvement of antimicrobial activity. *Biochem. Cell Biol.* 80: 65–74.

Tachezy, J., Kulda, J., Bahnikova, I., Suchan, P., Razga, J. and Schrevel, J. (1996) *Trichomonus foetus*: iron acquisition from lactoferrin and transferring. *Exp. Parasitol.* 83: 216-228.

Takase, K. 1998. Reactions of denatured proteins with other cellular components to form insoluble aggregates and protection by lactoferrin. *FEBS Letters* 441:271-274.

Takase, K., Higashi, T. and Omura, T. 2002. Aggregate formation and the structure of the aggregate of disulfide-reduced proteins. *J. Protein Chem.* 21:427-433.

Tanaka, T., Omata, Y., Saito, A., Shimazaki, K., Igarashi, I. and Suzuki, N. (1996) Growth inhibitory effects of bovine lactoferrin to *Toxoplasma gondii* parasites in murine somatic cells. *J. Vet. Med. Sci.* 58: 61-65

Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H. and Kawase, K. 1991. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.* 74: 4137-4142.

Tomita, M., Takase, M., Bellamy, W. and Shimamura, S. 1994. A review: the active peptide of lactoferrin. *Acta Paediatr. Jpn.* 36: 585-591.

Ueta, E., Tanida, T. and Osaki, T. 2001. A novel bovine lactoferrin peptide, FKCRRWQWRM, suppresses *Candida* cell growth and activates neutrophils. *J. Pept. Res.* 57: 240–249.

Van Berkel, P. H. C., Geerts, M. E. J., van Veen, H. A., Mericskay, M., deBoer, H. A. and Nuijens, J. H. 1997. N-terminal stretch Arg<sup>2</sup>, Arg<sup>3</sup>, Arg<sup>4</sup> and Arg<sup>5</sup> of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA. *Biochem. J.* 328: 145-151.

Van Snick, J. L., Mass, P. L. 1976. The binding of lactoferrin to mouse peritoneal cells. *J. Exp. Med.*, 144: 1568-1580.

Vogel, H. J., Schibli, D. J., Jing, W., Lohmeier-Vogel, E. M., Epand, R. F. and Epand, R. M. 2002. Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides.

Biochem. Cell Biol. 80: 49–63.

Vorland, L. H., Ulvatne, H., Andersen, J., Haukland, H., Rekdal, Y., Svendsen, S. and Gutteberg, T. J. 1998. Lactoferricin of bovine is more active than lactoferricins of human, murine and caprine origin. *Scand. J. Infect Dis.* 30: 513-517.

Vorland, L. H., Ulvatne, H., Andersen, J., Haukland, H., Rekdal, Y., Svendsen, S. and Gutteberg, T. J. 1999. Antibacterial effects of lactoferricin B. *Scand. J. Infect Dis.* 31: 179-184.

Vorland, L. H., Ulvatne, H., Andersen, J., Haukland, H., Rekdal, Y., Svendsen, S. and Gutteberg, T. J. 1999. Interference of the antimicrobial peptide lactoferricin B with the action of various antibiotics against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Scand. J. Infect Dis.* 31: 173-177.

Weinberg, E. D. 1984. Iron withholding: a defense against infection and neoplasia. *Physiol. Rev.* 64: 65-102.

Westhoff, D. C., Engler, T. (1973) The fate of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in cottage cheese whey. *J. Milk Food Technol.* 36: 19-22.

Yasin, B., Pang, M., Turner, J. S., Cho, Y., Dinh, N. N., Waring, A. J. et al. 2000. Evaluation of the inactivation of infectious herpes simplex virus of host-defense peptides. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**: 187–194.