

Protimikrobna aktivnost peptidov, pridobljenih z encimsko hidrolizo laktoferina

Špela Gruden¹, Petra Mohar Lorbeg², Bojana Bogovič Matijašič², Nataša Poklar Ulrih¹

¹Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za biokemijo in kemijo živil, Slovenija, Spela.Gruden@bf.uni-lj.si, natasa.poklar@bf.uni-lj.si
²Biotehniška fakulteta, Inštitut za mlekarstvo in probiotike, Slovenija, petra.mohar@bf.uni-lj.si, Bojana.BogovicMatijasic@bf.uni-lj.si

LIFE FOR ACID WHEY

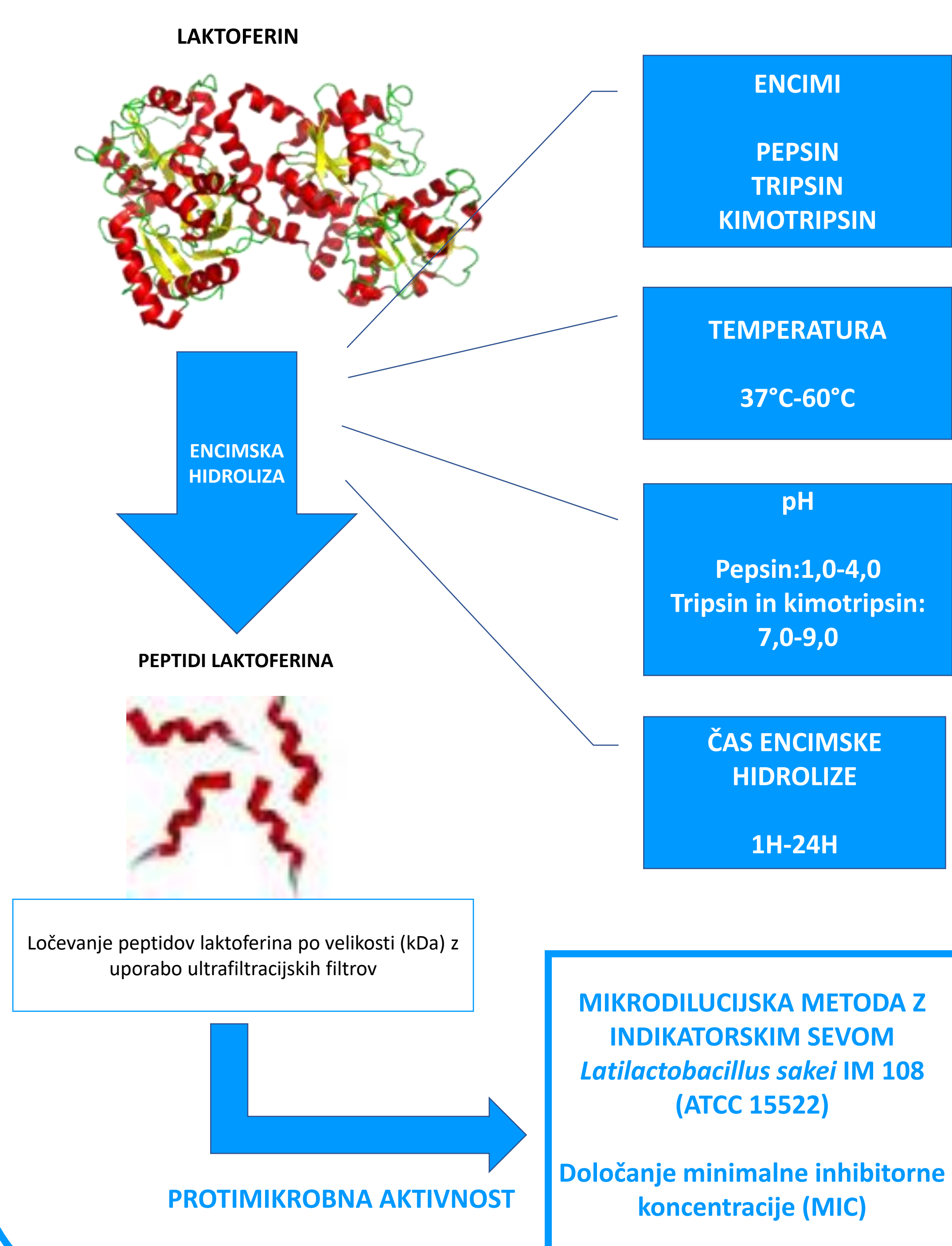


POVZETEK/ABSTRAKT

Laktoferin je glikoprotein, ki ima v telesu sesalec številne funkcije in ima posledično pomembno vlogo v primarnem imunskem sistemu. Ena od pomembnih funkcij laktoferina je njegovo protibakterijsko delovanje. Laktoferin deluje protibakterijsko proti številnim po Gramu-pozitivnim in po Gramu-negativnim bakterijam. Študije so pokazale, da encimska hidroliza laktoferina vodi v nastanek laktoferinskih peptidov, ki imajo boljšo protibakterijsko aktivnost proti po Gramu-pozitivnim in po Gramu-negativnim bakterijam, kot nativen protein. Zaradi naraščajoče odpornosti bakterij proti antibiotikom predstavljajo laktoferinski peptidi velik potencial kot naravni antibiotiki. V naši raziskavi smo se ciljno osredotočili v pridobivanje novih protibakterijskih peptidov iz laktoferina, ki bi imeli boljšo protibakterijsko aktivnost kot nativen protein. Le-to smo skušali doseči s preskušanjem različnih encimov in pogojev encimske hidrolize, kot so pH, temperatura in čas encimske hidrolize. Tako smo pridobili peptide, ki so imeli boljšo protimikrobno aktivnost kot laktoferin.

Lactoferrin is a glycoprotein that has numerous functions in the mammalian body and therefore plays an important role in the innate immune system. One of the most important lactoferrin functions is its antibacterial activity as lactoferrin is effective against a wide range of Gram-positive and Gram-negative bacteria. In addition, enzymatic hydrolysis of lactoferrin has been shown to result in the generation of lactoferrin peptides, that have even more potent antibacterial activity against various Gram-positive and Gram-negative bacteria than the native protein. Due to increasing resistance of bacteria to antibiotics, these lactoferrin-derived peptides show great potential as natural antimicrobials. The aim of our study was to produce new lactoferrin-derived peptides with better antibacterial activity than native protein by selecting different enzymes for enzymatic hydrolysis and using different enzymatic conditions such as pH, temperature and duration of enzymatic hydrolysis. This allowed us to generate lactoferrin peptides with better antibacterial activity than lactoferrin.

METODE DELA



REZULTATI

Izvedli smo številne encimske hidrolize laktoferina s pepsinom, tripsinom in kimotripsinom pri različnih pogojih encimske hidrolize ter jim merili protimikrobno aktivnost z indikatorskim sevom *Latilactobacillus sakei* IM 108. Protimikrobna aktivnost celotnih hidrolizatov pridobljenih z encimsko hidrolizo tako s pepsinom kot s tripsinom in kimotripsinom niso izkazovali boljše protimikrobne aktivnosti kot laktoferin. Nadaljnjo smo posledično preučili vpliv velikosti peptidov (kDa) na protimikrobno aktivnost peptidov in sicer tako, da smo peptide ločili na posamezne velikosti z uporabo ultrafiltracijskih filtrov (z velikostjo por 10 kDa in 50 kDa). Tripsinski peptidi in kimotripsinski peptidi z velikostjo 10-50 kDa, pridobljeni pri pH 8,0 (37°C/4h), so pokazali boljšo protibakterijsko aktivnost kot laktoferin, medtem ko so ostali laktoferinski peptidi izkazovali isto ali višjo vrednost MIC.

Tabela 1: Protimikrobna aktivnost hidrolizatov laktoferina in p osameznih frakcij po ultrafiltraciji, pridobljenih z encimsko hidrolizo s pepsinom, tripsinom ali kimotripsinom pod različnimi pogoji encimske hidrolize. Vrednosti MIC, ki so bile nižje od tistih za laktoferin, so označene rdeče.

Table 1: Antimicrobial activity of lactoferrin hydrolysates obtained by enzymatic digestion by pepsin, trypsin, or chymotrypsin under different enzymatic hydrolysis conditions, and of individual UF fractions against *Latilactobacillus sakei* IM 108. MIC values that were lower than those for lactoferrin are marked in red.

Vzorci/Samples	Pogoji encimske hidrolize/Enzymatic conditions	MIC (mg/ml)
Laktoferin	/	0,016
Pepsinski hidrolizati	pH 3,0; 37°C/4h	0,08
Pepsinski peptidi (10-50 kDa)	pH 3,0; 37°C/4h	0,016
Tripsinski hidrolizati	pH 3,0; 37°C/4h	0,08
Tripsinski peptidi (10-50 kDa)	pH 8,0; 37°C/4h	0,0032

Vzorci/Samples	Pogoji encimske hidrolize/Enzymatic conditions	MIC (mg/ml)
Laktoferin	/	2,5
Tripsinski peptidi (10-50 kDa)	pH 8,0; 37°C/4h	1,25
Tripsinski peptidi (10-50 kDa)	pH 7,0; 37°C/4h	>10
Tripsinski peptidi (10-50 kDa)	pH 7,8; 37°C/4h	>10
Tripsinski peptidi (10-50 kDa)	pH 9,0; 37°C/4h	>10
Tripsinski peptidi (10-50 kDa)	pH 8,0; 37°C/2h	>10
Tripsinski peptidi (10-50 kDa)	pH 8,0; 37°C/24h	>10

Vzorci/Samples	Pogoji encimske hidrolize/Enzymatic conditions	MIC (mg/ml)
Laktoferin	/	0,63
Kimotripsinski peptidi (10-50 kDa)	pH 8,0; 37°C/4h	0,08
Kimotripsinski peptidi (10-50 kDa)	pH 9,0; 37°C/4h	>10
Kimotripsinski peptidi (10-50 kDa)	pH 8,0; 50°C/4h	0,63
Kimotripsinski peptidi (10-50 kDa)	pH 9,0; 50°C/4h	>10
Kimotripsinski peptidi (10-50 kDa)	pH 8,0; 60°C/1h	0,63

ZAKLJUČKI/CONCLUSIONS

Z encimsko hidrolizo laktoferina s tripsinom in kimotripsinom pri pogojih encimske hidrolize pH 8,0 (37°C/4h) smo pridobili peptide laktoferina velikosti od 10 do 50 kDa, kateri so imeli boljšo protimikrobno aktivnost kot laktoferin. S tem smo tudi demonstrirali, da imajo pogoji encimske hidrolize (pH, temperatura in čas encimske hidrolize) pomemben vpliv na potek encimske hidrolize in na pridobivanje določenih peptidov.

Poleg tega pa smo tudi pokazali, da ima na izražanje protimikrobne aktivnosti vpliv tudi velikost peptidov.

Enzymatic hydrolysis of lactoferrin with trypsin and chymotrypsin under enzymatic conditions at pH 8.0 (37°C/4h), we generated lactoferrin peptides, size from 10 to 50 kDa, that showed better antimicrobial activity than lactoferrin. We demonstrated that enzymatic conditions (pH, temperature and time of enzymatic hydrolysis) have great impact on enzymatic hydrolysis itself and also on the generation of certain peptides. Furthermore, we also demonstrated that size of peptides for the expression of antimicrobial activity.

