

# 动物蛋白酶酶解制备广西产牡蛎肉 抗肿瘤活性肽的实验研究

陈艳辉<sup>1</sup>, 李超柱<sup>1</sup>, 黎丹戎<sup>2,\*</sup>, 蒋 维<sup>2</sup>, 孙闻续<sup>2</sup>, 李家明<sup>1</sup>, 方怀仪<sup>1</sup>

(1. 广西钦州学院, 广西钦州 535000;

2. 广西医科大学, 广西南宁 530021)

**摘要:**目的:采用动物蛋白酶作为工具酶对牡蛎蛋白质进行酶解,并对酶解条件采用正交实验进行优化。以期获得具有抑制肿瘤细胞生长的活性肽。方法:利用正交实验  $L_9(3^3)$ ,以氨基酸生成率和肿瘤细胞生长抑制率为观察指标,确定动物蛋白水解酶水解广西产牡蛎肉的水解条件如温度、酶量、水解时间,并对最佳水解产物进行柱层析和超滤分离获得不同分子量的多肽,采用 MTT 法检测了各组分对鼻咽癌细胞 CNE-1 生长的抑制作用。结果:动物蛋白水解酶在 60℃、酶的质量分数 2.0%、水解时间为 4h 的水解条件下获得的水解氨基酸含量最高;水解产物在分子量为小于 3000Da 多肽具有明显地抑制鼻咽癌 CNE-1 细胞的生长作用。结论:选取动物蛋白水解酶作用的最佳条件,可以获得具有抗肿瘤细胞生长的牡蛎蛋白活性肽,具有进一步开发应用的价值。

**关键词:**牡蛎,活性肽,抗肿瘤

## Experimental research on animal proteasome enzymatic hydrolysis for preparing antitumor bioactive peptide from oyster of Guangxi province

CHEN Yan-hui<sup>1</sup>, LI Chao-zhu<sup>1</sup>, LI Dan-rong<sup>2,\*</sup>, JIANG Wei<sup>2</sup>, SUN Wen-xu<sup>2</sup>, LI Jia-ming<sup>1</sup>, FANG Huai-yi<sup>1</sup>

(1. Qinzhou College of Guangxi, Qinzhou 535000, China;

2. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**Abstract:** Objective: Using animal protein proteasome as a tool enzyme to enzymatic hydrolyze with oyster protein, the bioactive peptide that can inhibit the growth of tumour cells was obtained, and condition of enzymatic hydrolysis was optimized by orthogonal experiment. Methods: according to observed indicators of amino nitrogen production rate and tumor cell growth inhibition, definite technological parameters of the hydrolysis conditions such as temperature, enzyme amount and time on hydrolyzing Guangxi oyster by animal protein zymohydrolysis were determined by orthogonal test  $L_9(3^3)$ . Polypeptide of different molecular weight by means of column chromatography, ultrafiltration of the best hydrolysate was gotten. The inhibited effects of all the constituents on the growth of nasopharyngeal carcinoma cells CNE-1 were tested by MTT. Results: The highest content of hydrolysis amino nitrogen was obtained on the condition that the temperature of animal protein zymohydrolysis of 60℃, that mass fraction of the enzyme of 2.0%, and that hydrolyzing time of 4h. The polypeptide that with less than 3000Da molecular weight has evident inhibited effects on the growth of nasopharyngeal carcinoma cells CNE-1. Conclusion: We can get oyster protein bioactive peptide that can inhibit the growth of tumour cells on the best condition of animal protein zymohydrolysis. The research is worth a further development and application.

**Key words:** oyster; bioactive peptide; antitumor

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)08-0167-03

蛋白质是一类最重要的生物大分子,是生物功能的主要载体。天然蛋白质不完全水解产生的长短

不一的一些肽段具有其前体所没有的特殊生理功能,这些有特殊的生理活性的肽类称为生物活性肽,而非活性肽在体内仅起氨基酸营养源的作用。海洋天然活性物质抗肿瘤研究是抗肿瘤药物研发的一个重要领域<sup>[1]</sup>,但有关海洋生物活性肽抗肿瘤作用研究则仍未得到足够重视。这是因为天然存在的海洋活性肽在生物体中含量低,而且提取困难,难以实现大量生产,化学合成的活性肽成本昂贵<sup>[2]</sup>。因此有必要以来源丰富的海洋动物蛋白为原料,水解分离具有

收稿日期: 2009-12-30 \* 通讯联系人

作者简介: 陈艳辉(1958-),女,副教授,研究方向:天然产物化学和有机合成化学。

基金项目: 广西自然科学基金(桂科自 0832281);广西教育厅面上项目(200708MS072、200911MS241)。

特殊活性的小分子肽段,实现规模化大生产小分子多肽。牡蛎也称大蚝,是广西钦州海洋水产品中产量最高的经济贝类。大量的文献报道称,牡蛎提取物或蛋白水解物中存在着免疫调节、抗肿瘤的生物学效应、抗氧化、抗衰老、降血糖作用及抗病毒抗菌等功能物质<sup>[3-4]</sup>。为了进一步开发牡蛎的药用资源,寻找结构特异、活性独特的抗肿瘤活性多肽,本课题利用动物蛋白酶为工具酶,探讨酶水解牡蛎蛋白的最佳条件,并测定了各水解产物的抗肿瘤活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

牡蛎 购自广西钦州水产品市场,经广西水产研究所李咏梅研究员鉴定为近江牡蛎(*Crassostrea rivularis*);乙腈、甲醇 色谱纯,Merck公司;动物蛋白水解酶  $\geq 200\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,广西南宁庞博生物工程有限公司。

多功能食品粉碎机 上海海菱公司;高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂;冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司;紫外检测仪 日本岛津仪器有限公司;数字酸度计 上海大普仪器有限公司;微型等电聚焦电泳仪 美国 BIO-RAD 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 牡蛎肉的酶解工艺的确定 取牡蛎肉,清洗,匀浆,选择动物蛋白酶,酶解工艺条件的设计见表1,分别在各反应条件下进行牡蛎肉蛋白质的水解实验。酶解结束后,95℃灭酶,分别测定每一反应条件下氨基氮生成率。

表1 动物蛋白酶水解牡蛎肉蛋白质的正交实验因素水平表

水平	因素		
	A 温度(℃)	B 加酶量(%)	C 时间(h)
1	40	0.5	3
2	50	1.0	4
3	60	2.0	5

1.2.2 氨基氮生成率的测定 采用甲醛滴定法测定氨基氮总量,凯氏定氮法测定总氮。氨基氮生成率按照下式计算:

$$\text{氨基氮生成率}(\%) = (\text{游离氨基氮总量} / \text{总氮}) \times 100\%$$

### 1.2.3 牡蛎酶解液中活性肽的分离制备工艺路线

原料蛋白→预处理→选择最佳酶解条件水解→高温灭酶→活性炭脱苦味去色→柱层析、超滤膜分离→冷冻干燥→组成与结构鉴定

### 1.2.4 牡蛎肽对鼻咽癌 CNE-1 细胞生长抑制作用

取指数生长期 CNE-1 细胞用 0.5% 胰蛋白酶消化,加入含小牛血清的培养液计数并稀释至  $1 \times 10^5$  个/mL。将稀释的细胞悬液按 100 $\mu\text{L}$ /孔接种至 96 孔板,置于 37℃,5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24h 至细胞贴壁后,加入不同分子量大小及不同浓度的牡蛎活性肽,每个浓度设 3 个平行孔,继续培养 24h,加入 20 $\mu\text{L}$  的 5mg/mL 的 MTT,于 37℃、5% 的 CO<sub>2</sub> 条件下孵育 4h,弃尽孔内液,每孔中加入 100 $\mu\text{L}$  的 DMSO 溶解 MTT 产物。用酶标仪振荡 30s 后于 490nm 处测定每个孔的 OD 值。实验中另设只加细胞而不加任何药物的

空白对照组,以 PBS 补足体积。按下列公式计算抑制率:

$$\text{生长抑制率}(\%) = (1 - \text{用药平均 A 值} / \text{对照平均 A 值}) \times 100\%$$

当生长抑制率为 50% 时所对应的活性肽浓度称为半数抑制浓度 IC<sub>50</sub>。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶水解条件的选择与确定

采用正交设计研究了温度、加酶量和反应时间 3 个单因素对酶解液水解率的影响,优化动物蛋白酶的酶解工艺参数,确定最佳酶解条件。由表 2 可见:影响动物蛋白酶酶解液氨基氮生成率和抗肿瘤活性的主要因素依次为温度 > 时间 > 酶用量,其中酶解温度对动物酶解液的抗肿瘤活性影响最大,在酶解时间相同的条件下,随着酶解温度的增加,牡蛎蛋白的水解度增大,温度为 60℃ 时,动物蛋白酶对牡蛎蛋白的水解度最大。温度对反应速率的影响主要是影响反应速率常数,在较低的温度范围内,反应速率常数随着温度的增加而增加,因而酶反应速率增加。加入酶的量越多,水解程度越高,在温度 60℃ 时,2‰ 的酶量,4h 后蛋白已水解彻底。且水解程度越高,对鼻咽癌细胞的生长抑制作用越强,IC<sub>50</sub> 值越小,结果见表 2。

表2 蛋白酶水解正交实验方案及实验结果

实验号	A	B	C	空白	氨基氮生成率(%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
1	1(40)	1(0.5)	1(3)	1	24.61	562
2	1	2(1.0)	2(4)	2	35.37	353
3	1	3(2.0)	3(5)	3	42.11	335
4	2(50)	1	2	3	81.29	152
5	2	2	3	1	43.63	330
6	2	3	1	2	52.34	216
7	3(60)	1	3	2	79.50	165
8	3	2	1	3	77.71	189
9	3	3	2	1	99.43	120
K <sub>1</sub>	102.09	147.74	154.66			
K <sub>2</sub>	177.26	194.37	216.09			
K <sub>3</sub>	256.64	199.88	165.24			
R	154.55	52.14	61.43			
k <sub>1</sub>	1250	879	967			
k <sub>2</sub>	698	872	625			
k <sub>3</sub>	474	671	830			
R	774	208	342			
以氨基氮/总氮结果分析						
各因素主次:A > C > B						
以 IC <sub>50</sub> 结果分析						
各因素主次:A > C > B						
最佳水平组 A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> C <sub>2</sub>						

### 2.2 牡蛎肽不同水解分子对鼻咽癌细胞生长的影响

本研究所采用的动物酶主要含有胰蛋白酶和 Flavourzyme,该复合酶共同作用的水解产物的多肽分子量分布是连续的,其范围主要分布在 2000 ~ 50000Da 之间,而 60% 的水解产物主要集中在小于 1000~3000Da 间。从表 2 的实验结果可见,牡蛎蛋白经酶解反应后其产物抗癌活性有较大的差异,说明酶解反应过程的生成众多的短肽和游离的氨基酸,其中可能含有长度不同的多肽具有抑制肿瘤细胞生长的作用。因此,本研究将对鼻咽癌细胞抑制作用

最强的水解产物进一步分离、超滤后获得不同分子量大小的多肽,不同浓度的牡蛎多肽作用于鼻咽癌 CNE-1 细胞后,采用 MTT 法测定其对细胞的生长抑制作用。从表 3 可以看出,分子量为 3000Da 的牡蛎多肽对鼻咽癌 CNE-1 细胞的生长抑制率出现明显的量效关系,即浓度越高,抑制率越强。能够抑制肿瘤细胞生长的活性肽主要存在于分子量小于 14000Da 的肽段中。

表 3 不同浓度的牡蛎多肽对鼻咽癌 CNE-1 细胞的生长抑制率(n=3)(%)

不同分子量的 水解多肽分子	浓度(μg/mL)				
	31.25	62.50	125	250	500
<3000Da 多肽	5.01	14.56	35.46	48.26	88.34
>14000Da 多肽	-64.83	-69.09	-70.63	-71.23	-21.97
<14000Da 多肽	-68.62	-48.90	-45.89	7.87	22.97
牡蛎总水解物	-58.20	-82.77	54.17	43.04	17.76

### 3 讨论

由于利用蛋白酶解制备小分子多肽可实现规模化大生产,目前,活性肽的主要生产方法通过酶法制备,而酶的选择是生产活性肽的关键,酶的水解能力具有专一性,若想获得具有独特活性的多肽,单用一种酶有时效果不佳<sup>[6]</sup>,因此本研究采用动物蛋白水解复合酶系,该酶是由蛋白内切酶、外切酶和风味酶组成。评价水解产物优劣,过去一般以水解度(DH)和肽的得率为指标,本研究还结合活性肽对肿瘤细胞的生长抑制作用强弱为指标,综合评判牡蛎活性肽的水解效果。结果发现,水解氨基酸含量高的组分,活性肽分子量小于 3000Da 的水解产物,其抑制鼻咽癌细胞生长的能力较强。

在研究动物蛋白水解酶水解牡蛎蛋白的最佳水解条件时,本研究发现最适温度不是酶的特征常数,只有在固定时间条件下才有意义。随着时间的延长,酶的活力逐渐衰减,比如酶解 3h 的最适温度必然不同于酶解 4h 的最适温度,这一点常为国内文献所忽视。酶量过高时,由于酶本身的相互水解作用加强,会阻碍酶对底物的水解,并非酶量越多越好。

(上接第 166 页)

- [6] 张鹏.四川泡菜中酵母菌的分离筛选及其应用研究[D].东北农业大学硕士论文,2007:27-28.
- [7] 李金霞,程池,姚粟,等. Biolog 微生物自动分析系统—酵母菌鉴定操作规程的研究[J].食品与发酵工业,2006,32(7):50-53.
- [8] 孙玉英,谭海刚,张继泉,等.发酵木糖酵母菌株的选育[J].广州食品工业科技,2002(18):1-4.
- [9] 吕键,阮晓明,盛志艺,等.固相微萃取与同时蒸馏萃取法分析香精成分比较[J].烟草科技/烟草化学,2003(2):25-28.
- [10] 李剑芳,张灏.发酵猕猴桃汁的研究(II)—风味成分的鉴定[J].食品与发酵工业,1999,25(6):14-18.
- [11] Zhiqiang Liu, Zhongce Hu. Optimization of cultivation condition for the production of 1,3-dihydroxyacetone by *Pichia membranifaciens* using response surface methodology [J].

在最佳反应条件下,随着时间的推移,水解程度加大,水解产物的分子量减小,水解液的肽段分子量分布会不断地发生变化。因此进行大规模水解牡蛎蛋白前必须进行水解条件的优化组合。

超滤原理近似机械筛分,是利用膜的选择性,以膜两侧存在的一定量能量差作为推动力,通过溶液中各组分透过膜的迁移速率的不同而实现非均相物系的分离。由于超滤膜具有不对称微孔结构,且采用薄层流道和湍流促进结构,减少膜的污染,在分离过程中,使得大分子溶质和微粒(如胶体或淀粉等)随溶液切向流经膜表面,而小分子物质和溶剂则在压力驱动下穿过致密层上的微孔而进入膜的另一侧,因而超滤膜可以长期连续使用并保持较恒定的产量和分离效果。与传统工艺相比较,超滤不仅可以提高产品的纯度、节约溶剂或试剂的耗用量,而且能够实现连续化分离纯化,缩短生产周期。正是利用这一节能减排的技术,本研究获得了具有较强抗肿瘤活性,分子量小于 3000Da 的多肽。因此有必要进一步对分子量低于 14000Da 的多肽进行系统的分离纯化,以其获得更多的活性分子。

### 参考文献

- [1] 林文翰.我国海洋生物的药学研究思考[J].中国天然药物,2006,4(1):10-14.
- [2] 韩玉谦,冯晓梅,管华诗.海洋活性多肽的研究进展[J].中国海洋大学学报,2004,34(5):761.
- [3] 林伟锋,赵谋明,程朝阳.海洋生物活性肽的制备及其研究状况[J].食品工业科技,2003(9):90-93.
- [4] 李鹏,李祺福,黄大川,等.僧帽牡蛎天然活性多肽 BPO21 抗人胃癌腺 BGC2823 细胞活性研究[J].厦门大学学报:自然科学版,2002,41(5):618.
- [5] Je J, Park P, M S. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska Pollack (*Theragra chalcogra*) from protein hydrolysate [J]. Food Research International, 2005, 38: 45-50.
- [6] 蒋传葵.工具酶的活力测定[M].上海:上海科学技术出版社,1982:104-168.
- [7] Biochemical Engineering Journal, 2008, 38(3): 285-291.
- [12] Ai V Tran, Robert P, Chambers. Ethanol fermentation of red oak acid prehydrolysate by the yeast *Pichia stipitis* CBS 5776 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1986, 8(7): 439-444.
- [13] Cregg J M, Vedeck T S, Raschke W C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris* [J]. Bio/Technology, 1993(11): 905-910.
- [14] 黑龙江省应用微生物研究所酶制剂组.霉菌 α-半乳糖苷酶分解棉子糖的初步研究[J].微生物学通报,1978(6).
- [15] 杨莹,徐艳文,薛军侠,等.葡萄酒相关酵母的香气形成及香气特征[J].微生物通报,2007,34(4):758.
- [16] 孙丽平,汪东风,张莉,等.利用鳕鱼皮蛋白制备热反应型肉味调味基料的研究[J].中国海洋大学学报,2009,39(3):249-252.