

木瓜蛋白酶制备大豆抗癌活性肽的条件优化

吴非, 于胜男, 葛锡娟, 刘畅, 李响

(东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 用木瓜蛋白酶对大豆分离蛋白进行酶解, 制备大豆抗癌活性肽, 并对其细胞生长抑制率、水解度和木瓜蛋白酶的最优作用条件进行研究。结果表明: 在整个酶解过程中, 大豆抗癌活性肽都具有明显的抗癌作用, 但水解度与大豆抗癌活性肽的细胞生长抑制率之间不呈线性关系。底物质量浓度、酶用量、酶解温度、酶解时间和反应 pH 值都影响大豆抗癌活性肽的细胞生长抑制率。木瓜蛋白酶制备大豆抗癌活性肽的最优酶解条件为: 底物大豆抗癌活性肽的浓度 6g/100mL、酶用量 7000U/g、酶解温度 55℃、酶解时间 4h、反应 pH7.5, 在此条件下得大豆抗癌活性肽细胞生长抑制率为 28.13%。

关键词: 木瓜蛋白酶; 大豆抗癌活性肽; 最优条件

Optimization of Preparation Conditions for Soybean Anticancer Peptides by Papain Hydrolysis

WU Fei, YU Sheng-nan, GE Xi-juan, LIU Chang, LI Xiang

(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In this study, operating conditions for the enzymatic preparation of anticancer peptides from soybean protein isolate with papain were optimized for maximum inhibitory rate against the growth of human gastric cancer SGC-7901 cells. Peptides with the highest anticancer activity were obtained after 4 h of hydrolysis at pH 7.5 and 55 °C with papain at a dose of 7000 U/g and a substrate concentration of 6 g/100 mL. All hydrolysates collected at selected time points during the hydrolysis process had obvious anticancer activity, while no linear relationship between degree of hydrolysis and cell growth inhibitory rate was found. All substrate concentration, enzyme dose, hydrolysis temperature, hydrolysis time and pH could affect cell growth inhibition rate of hydrolysates.

Key words: papain; soybean anti-cancer peptides; optimal conditions

中图分类号: Q814.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)07-0148-05

大豆是中国古老的作物之一, 含有 35%~40% 的蛋白质, 是食物蛋白的一种重要来源。大豆肽是指大豆蛋白经蛋白酶作用后, 再经过特殊处理所得到的蛋白质的分解产物^[1-2]。大豆肽具有较高的营养价值, 同时也具有较高的功能活性如抗氧化、抗疲劳和抗高血压等^[3-4]。前期实验研究结果表明, 用蛋白酶作用于大豆分离蛋白, 可以制备大豆抗癌活性肽; 在众多的蛋白酶中, 木瓜蛋白酶的作用效果最明显。目前国内外对制备大豆抗癌活性肽酶解条件的研究较少。

癌症是当今发病率最高的疾病, 我国每年约有 130 多万人死于癌症, 而且其发病率和死亡率还在逐年递增。合成的抗癌药物虽能有效地控制疾病, 但同时它也能造成免疫系统损伤、骨髓受抑制等副作用^[5]。我国是大豆的主产国, 大豆资源丰富, 研究大豆抗癌活性

肽具有十分重要的意义。大豆抗癌活性肽安全性高、毒副作用小、容易吸收、易于制备^[6-8]。本实验对生产大豆抗癌活性肽的酶解条件和水解度与抗癌活性之间的关系进行研究, 以为开发大豆抗癌活性肽产品、预防和辅助治疗疾病、促进大豆精深加工提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

大豆分离蛋白由国家大豆工程技术研究中心提供。

胃癌细胞 SGC-7901 由教育部国家乳品科学重点实验室提供; 木瓜蛋白酶 无锡杰能科生物有限公司; 其他试剂均为分析纯。

快速离心机 北京医用离心机厂; 凯氏定氮仪 上海新嘉电子有限公司; 冷冻干燥机 上海医用离心机

收稿日期: 2011-04-19

基金项目: 黑龙江省科技攻关计划项目(GA09B401-2)

作者简介: 吴非(1968—), 女, 教授, 博士, 研究方向为大豆产品精深加工。E-mail: wfneau@163.com

厂;超净工作台 北京安泰空气技术有限公司;CO₂细胞培养箱 上海博迅实业有限公司;倒置显微镜 日本 Olympus 公司;酶联免疫检测仪 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 原料常规指标测定

蛋白质含量的测定方法按照 GB/T 5009.5—2003《食品中蛋白质的测定》^[9],水分含量的测定方法按照 GB/T 5009.3—2003《食品中水分的测定》^[10],灰分的测定方法按照 GB/T 5009.4—2003《食品中灰分的测定》^[11]。

1.2.2 酶活力测定

采用福林-酚法进行测定,参照 SB/T 10317—1999《蛋白酶活力测定法》^[12]。

1.2.3 水解度(DH)测定

依据 pH-Stat 法^[13],蛋白质水解时会释放出氨基酸,使溶液的 pH 值发生变化,通过滴定保持蛋白酶的最佳反应 pH 值环境,因此,水解度可由水解过程中 NaOH 的消耗量来计算。

$$\text{水解度}/\% = V_{\text{NaOH}} \times (1/\alpha) \times (c/m_p) \times (1/H_{\text{tot}}) \times 100 \quad (1)$$

式中: V_{NaOH} 为水解过程中消耗的 NaOH 的体积/mL; m_p 为底物蛋白质的总质量/g; c 为 NaOH 的浓度/(mol/L); H_{tot} 为每克蛋白质中肽键的克当量数(取 7.8); α 为氨基酸的解离度, $1/\alpha = 1 + 10^{(\text{pK} - \text{pH})}$

1.2.4 MTT 法测定大豆抗癌活性肽对胃癌细胞生长的抑制率

取对数生长期胃癌细胞 SGC-7901 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液吹打成单细胞悬液,以每孔 4000~5000 个/200 μL 细胞浓度接种于 96 孔培养板中,每孔体积 200 μL 。置 37℃、5% 湿化的 CO₂ 培养箱中培养 24h。将不同质量浓度的大豆抗癌活性肽分别加到 96 孔板中,每孔分别加入滤液 100 μL ,同时设置 5 个平行孔,对照为 RPMI 1640 培养液。置 37℃、5% 湿化的 CO₂ 培养箱中培养 48h 后,小心吸弃孔内培养上清液,控干后每孔加入 5mg/mL 噻唑蓝(MTT)溶液 20 μL ,37℃ 继续孵育 4h,每孔再加 150 μL 二甲基亚砷,轻轻振荡 15min。选择 490nm 波长,在酶标仪上测定各孔光密度值^[14]。按公式(2)计算细胞生长抑制率。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{(\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{空白}}) - (\text{OD}_{\text{给药}} - \text{OD}_{\text{空白}})}{\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{空白}}} \times 100 \quad (2)$$

式中: $\text{OD}_{\text{对照}}$ 为不加样品的光密度; $\text{OD}_{\text{给药}}$ 为加入样品的光密度; $\text{OD}_{\text{空白}}$ 为不加胃癌细胞 SGC-7901 时的光密度。

1.2.5 木瓜蛋白酶水解大豆分离蛋白

配制 6g/100mL 大豆分离蛋白溶液,在 90℃ 热处理 15min,然后将反应条件调至木瓜蛋白酶反应的最适条件^[15],加入木瓜蛋白酶进行水解,得到大豆抗癌活性肽。反应过程中用 1mol/L 的 NaOH 溶液或 HCl 调节酸

碱度,使其一直处于酶的最适反应 pH 值,并使温度始终保持在酶反应的最适温度。酶解开始后 1、2、3、4、5、6h 时取酶解液,在 100℃ 条件下保温 15min,使酶失活,调节 pH 值到大豆分离蛋白等电点(PI 4.5)后,4000r/min 离心 15min,取上清液测水解度。将上清液冻干后,取一定质量的冻干粉溶解,过 0.2 μm 的滤膜,测定细胞生长抑制率。

1.2.6 酶解单因素对抗癌活性肽的活性影响

以底物质量浓度、酶用量、温度、水解时间、pH 值为单因素进行试验,以细胞生长抑制率为指标,研究单因素对于大豆分离蛋白的木瓜蛋白酶酶解液抗癌活性的影响。

1.2.6.1 底物质量浓度对抗癌活性肽的活性影响

采用木瓜蛋白酶,在 55℃、pH7.5、酶添加量 7000U/g 条件下,选取不同的底物质量浓度(4、5、6、7、8g/100mL)进行酶解反应,得到抗癌活性肽,分别对酶解 3、4、5h 时酶解液的细胞生长抑制率进行比较,选取较好的底物质量浓度。

1.2.6.2 酶用量对抗癌活性肽的活性影响

在 pH7.5、55℃、底物质量浓度 6g/100mL 的条件下,木瓜蛋白酶在不同的酶用量(4000、5000、6000、7000、8000、9000U/g)条件下反应得到抗癌活性肽,分别对酶解 3、4、5h 时酶解液的细胞生长抑制率进行比较,选取较好的酶用量。

1.2.6.3 酶解温度对抗癌活性肽的活性影响

采用木瓜蛋白酶,在 pH 值为 7.5、酶用量为 7000U/g、底物质量浓度为 6g/100mL 条件下制备大豆抗癌活性肽,选取不同的反应温度(45、50、55、60、65℃)进行考察,分别对酶解 3、4、5h 时的癌细胞生长抑制率进行比较,选取较好的酶解温度。

1.2.6.4 酶解时间对抗癌活性肽的活性影响

采用木瓜蛋白酶,在 55℃、pH7.5、酶添加量 7000U/g、底物质量浓度 6g/100mL 的条件下进行酶解反应,得到抗癌活性肽,分别对酶解 1、2、3、4、5、6h 时酶解液的细胞生长抑制率进行比较,选取较好的酶解时间。

1.2.6.5 酶解 pH 值对抗癌活性肽的活性影响

采用木瓜蛋白酶,在 55℃、酶用量为 7000U/g、底物质量浓度为 6g/100mL 条件下,选取不同的 pH 值(6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)条件进行酶解,反应得到抗癌活性肽,分别对酶解 3、4、5h 时酶解液的细胞生长抑制率进行比较,选取较好的酶解 pH 值。

1.2.7 木瓜蛋白酶制备大豆抗癌活性肽最优条件研究

以底物质量浓度、酶用量、酶解温度、酶解时间和 pH 值为因素,根据单因素试验结果确定其水平的范

围, 分别选取 5 个水平, 设计五因素五水平的正交试验 (表 1)。以细胞生长抑制率为指标确定木瓜蛋白酶制备大豆抗癌活性肽的最优条件。

表 1 $L_{25}(5^5)$ 正交试验因素水平设计
Table 1 Factors and levels in orthogonal array design

水平	因素				E pH
	A 底物质量浓度/(g/100mL)	B 酶用量/(U/g)	C 酶解温度/℃	D 酶解时间/h	
1	4	4000	49	2.5	6.0
2	5	5000	52	3.0	6.5
3	6	6000	55	3.5	7.0
4	7	7000	58	4.0	7.5
5	8	8000	61	4.5	8.0

1.2.8 数据处理

原始数据的整理采用 Microsoft Excel(Office 2007)软件完成; 实验数据采用 SAS8.1 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 大豆分离蛋白的常规指标和蛋白酶活力

所用大豆分离蛋白的蛋白质含量、水分含量、灰分含量分别为 90.33%、3.72%、3.04%。酶活力反映了 1g 酶制剂在适宜的条件下水解酪蛋白的能力。结果表明, 木瓜蛋白酶活力为 23106.3U/g。

2.2 单因素对抗癌活性肽活性的影响

2.2.1 底物质量浓度

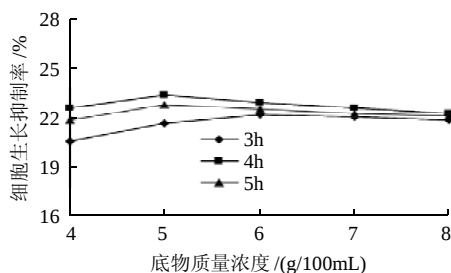


图 1 底物质量浓度对细胞生长抑制率的影响

Fig.1 Effect of substrate concentration on cell growth inhibitory rate of hydrolysates

如图 1 所示, 随着酶解时间由 3h 增加到 5h 时, 细胞生长抑制率先增大随后趋于稳定。同一酶解时间条件下, 当底物质量浓度达到 6g/100mL 时, 细胞生长抑制率略微下降, 所以单因素试验中选择最佳的底物质量浓度为 6g/100mL。

2.2.2 酶用量

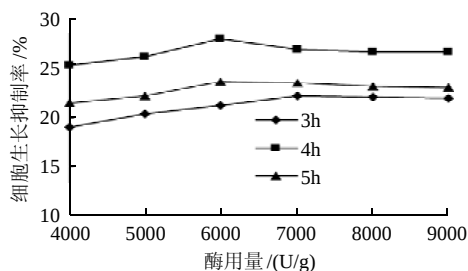


图 2 酶用量对细胞生长抑制率的影响

Fig.2 Effect of protease dosage on cell growth inhibitory rate of hydrolysates

如图 2 所示, 随着酶解时间由 3h 增加到 5h 时, 细胞生长抑制率随之增加, 但之后有所减小。相同酶解时间条件下, 随酶用量增大, 细胞生长抑制率的值也逐渐增大, 酶用量达到 7000U/g 以后, 细胞生长抑制率逐渐趋于平缓。因此, 选择 7000U/g 为较适酶用量。

2.2.3 酶解温度

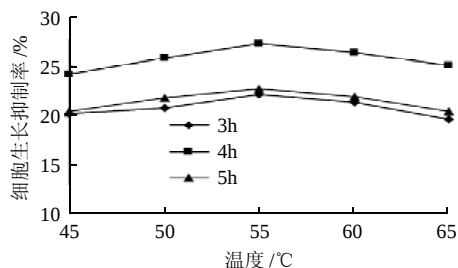


图 3 酶解温度对细胞生长抑制率的影响

Fig.3 Effect of temperature on cell growth inhibitory rate of hydrolysates

如图 3 所示, 木瓜蛋白酶的细胞生长抑制率随着酶解温度的升高都有所提高, 且都在温度 55℃ 时达到最高细胞生长抑制率。原因是酶属于蛋白质, 有一定的适宜作用温度范围, 当超过最适温度时, 酶会发生变性, 其活性降低。所以单因素试验中, 选择 55℃ 为最佳反应温度。

2.2.4 酶解时间

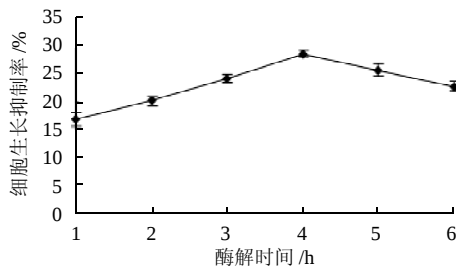


图 4 酶解时间对细胞生长抑制率的影响

Fig.4 Effect of hydrolysis time on cell growth inhibitory rate of hydrolysates

如图4所示,随着酶解时间的延长,细胞生长抑制率逐渐增加,在1~4h增加较为迅速,在4h以后有所下降。原因是随着酶解反应的进一步发生,可与蛋白酶反应的底物逐渐减少,酶切位点也逐渐减少,同时蛋白酶的活性也有所降低,产物的积累对酶的作用也会产生竞争性抑制,而且已经产生的有活性的肽段会被进一步水解,所以,酶解产物的活性有所下降。因此,单因素试验中,选择酶解时间4h为最佳作用时间。

2.2.5 酶解 pH 值

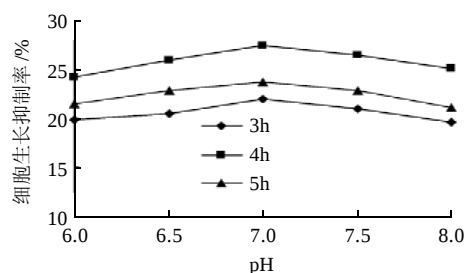


图5 酶解 pH 值对细胞生长抑制率的影响

Fig.5 Effect of pH on cell growth inhibitory rate of hydrolysates

如图5所示,随着酶解时间由3h增加到5h时,细胞生长抑制率呈现出先增加后减小的趋势。在pH值为7.5时,细胞生长抑制率相对高于其他pH值时的细胞生长抑制率,原因是酶发生作用有其最适的反应pH值,当低于或高于该值时,酶的活性结构可能会因为酸性或碱性的环境而有所改变,从而使其活性未能充分发挥。因此单因素试验中,选择最适反应pH值为7.5。

2.3 木瓜蛋白酶制备大豆抗癌活性肽条件的优化

表2 木瓜蛋白酶酶解大豆分离蛋白制备抗癌活性肽正交试验结果

Table 2 Orthogonal array design and results for optimizing the preparation of soybean anti-cancer peptides

试验号	A	B	C	D	E	细胞生长抑制率/%
1	1	1	1	1	1	19.01
2	1	2	2	2	2	21.45
3	1	3	3	3	3	25.18
4	1	4	4	4	4	27.35
5	1	5	5	5	5	27.40
6	2	1	2	3	4	27.21
7	2	2	3	4	5	28.08
8	2	3	4	5	1	22.25
9	2	4	5	1	2	25.84
10	2	5	1	2	3	26.11
11	3	1	3	5	2	28.02
12	3	2	4	1	3	26.89

续表2

试验号	A	B	C	D	E	细胞生长抑制率/%
13	3	3	5	2	4	26.37
14	3	4	1	3	5	24.09
15	3	5	2	4	1	26.54
16	4	1	4	2	5	23.84
17	4	2	5	3	1	24.07
18	4	3	1	4	2	24.18
19	4	4	2	5	3	23.11
20	4	5	3	1	4	25.04
21	5	1	5	4	3	16.81
22	5	2	1	5	4	22.07
23	5	3	2	1	5	22.09
24	5	4	3	2	1	24.88
25	5	5	4	3	2	19.57
k_1	24.08	22.98	23.09	23.77	23.35	
k_2	25.90	24.51	24.08	24.53	23.81	
k_3	26.38	24.01	26.24	24.02	23.62	
k_4	24.05	25.05	23.98	24.59	25.60	
k_5	21.08	24.93	24.09	24.57	25.10	
R	5.30	2.07	3.14	0.81	2.25	

从表2极差分析可知,各因素对木瓜蛋白酶水解大豆分离蛋白的影响次序依次为:底物质量浓度>酶解温度>反应pH值>酶用量>酶解时间。反应条件最佳组合为 $A_3B_4C_3D_4E_4$,即木瓜蛋白酶酶解大豆分离蛋白制备抗癌活性肽的最优条件为:酶解温度55℃、酶添加量7000U/g、反应pH7.5、酶解时间4h、底物质量浓度6g/100mL。在此条件下进行验证,得到大豆抗癌活性肽对细胞生长抑制率为28.13%,略高于正交试验中各组的结果。

2.4 大豆分离蛋白酶解物的癌细胞生长抑制率与水解度的关系

在正交试验优化条件下,由木瓜蛋白酶作用于大豆分离蛋白得到的大豆抗癌活性肽的癌细胞生长抑制率见图6,细胞生长抑制率在13.4%~27.36%之间变化。随着酶解时间的延长,水解度先迅速增大,之后虽有所增大但趋于平缓。在水解度达到最大值之前,细胞生长抑制率达到最大值27.36%;随酶解时间的继续延长,细胞生长抑制率有所下降。总体看,对胃癌细胞的生长抑制率表现出先增大后有所减小的趋势,在水解度20.95%时,表现出最大的细胞生长抑制率。

通过分析水解度与细胞生长抑制率的关系可以看出,水解度与细胞生长抑制率不呈线性关系。由此得知,大豆抗癌活性肽的细胞生长抑制率与酶解生成的肽段的大小及结构有直接关系,水解度只是反映大豆分离蛋白的肽键断裂情况和大豆肽段的平均分子质量的变化,不能反映所生成肽段的末端活性基团,也就不能

反映出大豆分离蛋白的木瓜蛋白酶酶解肽对细胞生长抑制率的高低。

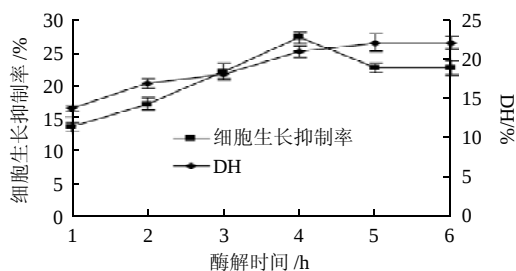


图6 大豆蛋白酶解物的细胞生长抑制率和水解度

Fig.6 Cell growth inhibitory rate and hydrolysis degree of soybean protein hydrolysates

3 结 论

大豆分离蛋白的各项性能指标为：蛋白质含量 90.33%、水分含量 3.72%、灰分含量 3.04%，木瓜蛋白酶的酶活力为 23106.3U/g。木瓜蛋白酶酶解大豆分离蛋白制备大豆抗癌活性肽的最优酶解条件为：底物质量浓度 6g/100mL、酶添加量 7000U/g、酶解温度 55℃、酶解时间 4h、反应 pH7.5。由木瓜蛋白酶作用于大豆分离蛋白得到的抗癌活性肽在整个酶解过程中都具有明显的抗癌作用，但水解度与大豆抗癌活性肽的细胞生长抑制率之间不呈线性关系。

参考文献：

[1] 李勇. 生物活性肽研究现况和进展[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(1): 3-9.

[2] JEONG J B, JEONG H J, PARK J H, et al. Cancer-preventive peptide lunasin from *Solanum nigrum* L. inhibits acetylation of core histones H3 and H4 and phosphorylation of retinoblastoma protein(Rb)[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55: 10707-10713.

[3] 邓成萍, 薛文通, 孙晓琳, 等. 不同分子量段大豆多肽功能特性的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(5): 109-112.

[4] GALVEZ A F, CHEN N, MACASIEB J, et al. Chemopreventive property of a soybean peptide (lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibit acetylation[J]. Cancer Res, 2001, 61: 7473-7478.

[5] 沈云婕, 朱珺. 新型分子靶向抗癌药物的研究进展[J]. 世界临床药物, 2007, 28(5): 288-292.

[6] GABOR M, MARILENA M, ANNAM A J. Synthesis and structural characterization of bioactive peptide conjugates using thioether linkage approaches[J]. J Peptide Sci, 2004, 10(5): 701-713.

[7] JEONG H J, JEONG J B, KIM D S, et al. The cancer preventive peptide lunasin from wheat inhibits core histone acetylation[J]. Cancer Lett, 2007, 255(1): 42-48.

[8] 张鹏, 张春江. 复合法制备功能性大豆多肽的研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(11): 117-121.

[9] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.5—2003 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.

[10] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.3—2003 食品中水分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.

[11] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.4—2003 食品中灰分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.

[12] 国家国内贸易局. SB/T 10317—1999 蛋白酶活力测定法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.

[13] ADLER-NISSEN J. Enzymatic hydrolysis of food protein[M]. Essex: Elsevier Applied Science Publishers Ltd, 1986: 122-144.

[14] 盛新华, 卿三华, 李镗洋. MTT、WST-8 法测定细胞生长抑制率的结果比较[J]. 山东医药, 2006(6): 20-21.

[15] 吴显荣. 木瓜蛋白酶的开发与应用[J]. 中国农业大学学报, 2005, 10(6): 11-15.