



石金钱龟多肽的制备工艺优化及体外抗肿瘤活性研究

刘杰¹ 邱瑞霞² 单凯^{3*}

1 暨南大学药学院 中药及天然药物研究所 广东广州 510632

2 暨南大学理工学院 食品科学与工程系 广东广州 510632 3 深圳凯联健康科技有限公司 广东深圳 518000

摘要: 石金钱龟不仅营养价值高,而且具有潜在的药用价值,通过研究龟肉酶解多肽的制备工艺及抗肿瘤作用,可以科学认识其营养保健功能。以石金钱龟肉为原料,碱性蛋白酶为水解酶,通过正交实验方法得到制备酶解多肽的最佳酶解条件为: pH 为 8.0、酶解温度 55℃、料液比 1.5/25g/mL、加酶量(酶/底物) 3.5%、酶解时间 4.0h。石金钱龟多肽体外抗肿瘤活性的结果表明,酶解产物对 MCF-7、MDA-MB-231、K562 等肿瘤细胞有较好的抑制增殖的作用,IC₅₀ 分别为 26.9mg/mL、38.4mg/mL、59.8mg/mL。说明石金钱龟酶解产物在体外表现出具有一定的抗肿瘤效果,具有良好的开发利用前景。

关键词: 石金钱龟 蛋白酶 酶解 抗肿瘤

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-5187(2017)03-051-02

石金钱龟(Mauremys mutica),又名黄喉拟水龟,隶属爬行动物纲、龟鳖目、龟科、拟水龟属,国内主要分布于南方地区,国外主要分布于越南等地^[1]。石金钱龟属于珍稀龟类,具有一定的观赏价值;以其为主要原料与中药配伍,既能起到抗癌解毒的功效,又能作为滋阴壮阳和延年益寿的高级滋补品,可以防治多种疾病和疑难杂症,且无任何副作用,民间常作为“药龟”进行食用,经济价值和营养价值极高^[2]。目前,对石金钱龟已经成功进行养殖和繁育^[3],但有关其龟肉尤其是龟肉酶解多肽的生理活性的研究尚属空白。鉴于此,本实验以石金钱龟肉为原料研究其水解多肽的最佳条件及体外抗肿瘤作用,旨在为石金钱龟的精深加工及其综合利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

原料:石金钱龟,试剂:胃蛋白酶、胰蛋白酶——安徽陆荣生物技术有限公司;中性蛋白酶、碱性蛋白酶——上海丹尼悦生物科技有限公司;木瓜蛋白酶——安徽陆荣生物技术有限公司;肌肽——湖南世纪华星生物工程有限公司;其他化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

精密 pH 计——常州德杜精密仪器有限公司;高速冷冻离心机——金坛市高科仪器厂;冷冻干燥机——上海欧蒙实业有限公司。

1.3 酶解液的制备工艺

石金钱龟—宰杀—去内脏、皮膜—粉碎龟肉—调节料液比—调节 pH—加酶—控温酶解(调节 pH 值在初始 pH 值)—沸水浴灭酶 8min 高速离心(10000 r/min-15 min)—酶解液。

1.4 蛋白酶的选择

取 5g 石金钱龟肉置于 100mL 圆底瓶中,加入 50mL 蒸馏水,调节至各酶的适宜 pH 值及温度(表 I),酶添加量(酶/底物, E/S) 3.0%,酶解 4 h,灭酶,离心。

表 I: 5 种不同蛋白酶的适宜酶解条件

酶的种类	胃蛋白酶	胰蛋白酶	中性蛋白酶	碱性蛋白酶	木瓜蛋白酶
pH	2.0	8.0	7.0	7.5	7.0
温度/℃	37	50	50	55	55

1.5 碱性蛋白酶酶解工艺条件优化

碱性蛋白酶酶解石金钱龟肉单因素实验的基本条件设定为料液比 1.0 : 25g/mL、pH 值 8.0、酶解温度 50℃、加酶量 (E/S) 2.0%、酶解时间 3h。通过改变其中一个条件,固定其他条件以分析各单因素对总多肽产量的影响,并用优化出的因素水平替换基本条件中的各因素水平进行逐一的单因素实验^[4]。各因素的水平梯度分别为:料液比 1.0 : 25、1.5 : 25、2.0 : 25、2.5 : 25g/mL; pH 值 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0;酶解温度 45、50、55、60℃;加酶量 (E/S) 1.5%、2.0%、3.0%、3.5%、4.0%;酶解时间 2.0、3.0、4.0、5.0h。

根据单因素实验设计正交实验,确定碱性蛋白酶制备石金钱龟多

肽的工艺条件。

正交实验设计的各因素及水平排列见表 II。

表 II: 正交实验因素水平表

水平	因素			
	A	B	C	D
	pH	温度/℃	加酶量(w/w)/%	料液比(w/v)/(g/mL)
1	8.0	50	2.0	1.5 : 25
2	8.5	55	2.5	2.0 : 25
3	9.0	60	3	2.5 : 25

1.6 酶解总产物含量测定

用优化出的工艺条件水解石金钱龟肉,对得到的酶解液进行冷冻干燥,将冻干样品密于 -20℃ 下称量保存。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的选择

由表 I 可知,龟肉在各种酶的适宜条件下,碱性蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解得到的总多肽产率高于 6.0%,其中碱性蛋白酶的总多肽产率最高(10.23%)。比较石金钱龟肉的酶解工艺优化及总多肽产率而言,这 3 种酶中碱性蛋白酶的价格最低,因此本实验选用碱性蛋白酶作为水解酶。

表 I: 不同蛋白酶水解石金钱龟肉糜所得总多肽产率

酶	胃蛋白酶	木瓜蛋白酶	中性蛋白酶	碱性蛋白酶	胰蛋白酶
总多肽产率(%)	8.20	6.39	6.98	10.23	6.27

2.2 单因素实验

2.2.1 pH 值对总多肽产率的影响:同一种酶在酶解时的最适 pH 值并不是一个常数,最适 pH 值因底物种类的不同而不同。由表 II 可知,总多肽产率先随 pH 值的增大而升高,在 pH 8.0 时,总多肽产率达到最大,随后开始呈现下降趋势。通常,酶只在适宜的 pH 值范围内,才能显示其催化活性,当在最适 pH 值条件下,酶催化反应速度达到最大^[5-7]。从实验结果看, pH 8.0 最佳。

表 II: pH 值对总多肽产率的影响

pH	产率
7.5	8.36±0.42
8.0	9.86±0.50
8.5	9.62±0.31

2.2.2 酶解温度对总多肽产率的影响:由表 III 可知,总多肽产率随温度的升高呈先上升后下降的趋势。在蛋白酶解过程中,温度影响蛋白酶催化反应的速度和酶的稳定性。温度升高,反应速度会加快,但酶是一种具有生物活性的蛋白质,温度过高会使酶的特定结构发生改变,活性会降低甚至失活,从而影响反应速度。从最适温度看,酶解温度 55℃ 最佳。

表 III: 温度对总多肽产率的影响



温度 (°C)	产率 (%)
50	7.62±0.31
55	8.84±0.47
60	8.21±0.30

2.2.3 加酶量对总多肽产率的影响:由表IV可知,随着加酶量的不断增加,总多肽产率不断上升,但当加酶量达到3.5%时,总多肽产率的增加趋于平缓,因此从成本角度考虑,选择加酶量为3.5%比较合理。

表IV:加酶量对总多肽产率的影响

加酶量 (%)	产率 (%)
3.0	8.88±0.62
3.5	8.91±0.63
4.0	8.96±0.66

2.2.4 时间对总多肽产率的影响:酶的催化速度会受到产物的影响,反应初期,产物的抑制作用小,随着时间的延长,酶活力逐渐下降,游离小肽和氨基酸增多,产物的抑制作用增加^[8]。由表V可知,反应进行4h后,总多肽产率随着时间的延长呈缓慢下降的趋势,因此选择4h为最佳酶解时间。

表V:时间对总多肽产率的影响

时间 (h)	产率 (%)
3.0	9.73±0.58
4.0	9.91±0.60
5.0	9.97±0.63

2.2.5 料液比对总多肽产率的影响:由表VI可知,当料液比为1.5/25 g/mL时,总多肽产率达到最高。当料液比增大时,总多肽产率提高并不明显。从成本角度看,料液比1.5/25 g/mL最佳。

表VI:料液比对总多肽产率的影响

料液比	产率 (%)
1.5/25	9.18±0.37
2.0/25	9.03±0.32
2.5/25	8.77±0.24

2.3 正交优化实验

正交实验设计及结果见表VII。

表VII:正交实验设计及结果

序号	酶解条件				总多肽产率 (%)
	I	II	III	IV	
1	7.5	50	3.0	1.5/25	9.35
2	7.5	55	3.5	2.0/25	9.61
3	7.5	60	4.0	2.5/25	9.32
4	8.0	50	3.5	2.5/25	9.38
5	8.0	55	4.0	1.5/25	10.36
6	8.0	60	3.0	2.0/25	9.69
7	8.5	50	4.0	2.0/25	8.69
8	8.5	55	3.0	2.5/25	8.82
9	8.5	60	3.5	1.5/25	8.39
K1	62.46	62.32	65.19	63.29	
K2	71.57	71.78	67.59	71.95	
K3	66.47	66.85	68.70	63.48	

(上接第49页)

分析[J].解放军医学杂志,2016,41(4):295-300.

[2]邵锋,李良海.低分子肝素辅助治疗重症社区获得性肺炎患者的荟萃分析[J].中国感染与化疗杂志,2016,16(3):247-251.

[3]高戈,冯喆,常志刚等.2012国际严重脓毒症及脓毒性休克诊疗指南[J].中华危重病急救医学,2013,25(8):501-505.

(上接第50页)

参考文献

[1]李功基,苏雪琴,刘燕华等.护理风险管理在产科护理管理中的应用及效果分析[J].黑龙江医药,2014,27(5):1231-1233.

[2]许璐,陈梅忠,覃丽珍等.风险管理在淋巴瘤化疗病区护理管理中的应用[J].广西医科大学学报,2016,33(6):1084-1086.

• 52 •

根据正交实验的结果及方差分析可知,因素I(pH)、II(温度)和IV(料液比)对总多肽产率有极显著影响,因素C(加酶量)有显著影响,影响总多肽产率的主要因素顺序是:IV>II>I>III。

在本实验中,总多肽产率越大越好,优化方案应选取各因素最大K值所对应的水平,因此选得最佳组合为I2II2III2IV1。将分析得到的最佳组合I2II2III2IV1进行验证实验,总多肽产率为11.09%。由验证实验结果可知,I2II2III2IV1为碱性蛋白酶最佳酶解工艺条件,即pH值8.0、酶解温度55℃、加酶量(E/S)3.5%、料液比1.5/25 g/mL、酶解时间4.0h。

2.4 酶解产物的抗肿瘤作用

表VII:酶解液抗肿瘤效果

细胞	IC ₅₀ (mg/mL)
MCF-7	26.9
MDA-MB-231	38.4
K562	59.8

3 结论

通过比较5种不同类型的蛋白酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶)对石金钱龟肉的酶解效果,确定碱性蛋白酶为最适水解酶。在单因素和正交实验的基础上,优化出酶解石金钱龟肉制备抗氧化肽的最佳酶解条件:pH值8.0、酶解温度55℃、加酶量(酶/底物,E/S)3.0%、料液比1.5/25g/mL、酶解时间4h,此条件下,总多肽产率达到11.09%。此外,还进行了体外抗肿瘤活性研究,石金钱龟总多肽体外抗肿瘤活性结果表明其具有一定的抗肿瘤效果。研究表明,石金钱龟肉酶解产物的抗乳腺癌活性较好,值得进一步开发利用。

参考文献

[1]吴迪森,曾旭权.中华龟鳖文化博览[M].北京:中国农业出版社,2007.

[2]李修峰,李蓓,张友谦.黄缘盒龟的生物学特征和经济价值[J].北京水产,2006(04).

[3]2007(04).Ryan J T, Ross R P, Bolton D, et al. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish [J].Nutrients, 2011, 3(9): 765-791.

[4]曲相如,孙景春,卢秀花,胡婷婷,曹姗姗,曹霞.实验性肝损伤动物模型的制备和评价[J].中国实验诊断学,2009(10).

[5]许庆陵,曾庆祝,朱莉娜等.鲢酶解物对羟自由基的清除作用[J].水产学报,2004,28(1):93-99.

[6]王春容.奥美拉唑与西咪替丁治疗应激性胃溃疡临床研究[J].中国现代药物应用,2013(18).

[7]张尚鹏,徐星娥,陈华栋,厉亚,楼蓉,张慧慧,陈艳晓.养心复脉饮对大鼠肝微粒体细胞色素P450亚型酶活性的影响[J].医药导报,2016(01).

[8]陈伟良,伍振峰,邓中银,胡鹏翼,王芳,郑琴,杨明.中医药在抗胃溃疡研究应用中的现状与进展[J].中国实验方剂学杂志,2013(08).

[4]王海波,徐丽娟,李克鹏等.KDIGO标准APACHE II与SOFA评分对脓毒症急性肾损伤患者的预后评估[J].中国急救医学,2013,33(6):499-502.

[5]罗勇,赵佳晖,韩毅力等.氮质血症期肾癌患者接受腹腔镜肾部分切除术后肾功能转归[J].现代泌尿外科杂志,2014,19(6):367-370.

[3]陈少芸,吴丹燕,黄旭华等.风险管理在手术室消防安全护理管理中的应用[J].护理实践与研究,2016,13(9):107-108,109.

[4]苏临英.护理安全风险管理体系在手术室护理管理中的应用[J].中华现代护理杂志,2014,20(19):2418-2420.

[5]田宏.探讨风险管理在护理管理中的应用分析[J].世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊),2014,15(31):428-428.