

水解乳蛋白的制备及在细胞培养中的初步应用

田 伟^{1,2}, 冯玉萍^{1,2}, 李明生^{1,2}, 崔梦楠¹, 靳冬武², 龙仕和¹, 马忠仁^{1,2*}

¹西北民族大学生命科学与工程学院; ²甘肃省动物细胞工程技术研究中心, 兰州 730030

摘要:采用正交法优化复合酶(胰酶和中性蛋白酶)水解凝乳酶干酪素制备水解乳蛋白(lacto-protein hydrolysate, LPH)的制备工艺,通过 BHK 和 Vero 细胞的培养效果检测水解乳蛋白的促细胞生长作用。结果显示水解乳蛋白的最佳制备工艺为:胰酶:中性蛋白酶=2:1(质量比),40 ℃,pH 7.0,酶/底物(E/S)=1:5(质量比)水解 6 h。所得产物氨基酸含量 3.21 g/L,多肽含量 35.63 g/L,游离氨基酸含量 14.17 mg/mL,收率达 40.20%。BHK 和 Vero 细胞培养 24 h,细胞密度均为各自空白的 2.0 倍,分别为 Hyclone 产品的 1.0 倍和 0.86 倍;培养 48 h,分别为各自空白的 5.0 倍和 4.0 倍,均为 Hyclone 产品的 0.88 倍。因此,该工艺简单,耗时短,制备得水解乳蛋白对 BHK 和 Vero 细胞生长有明显的促进作用。

关键词:水解乳蛋白;制备;细胞培养;应用

中图分类号:Q813.1

文献标识码:A

Preparation of Lacto-protein Hydrolysate and Study on Its Preliminary Application in Cell Culture

TIAN Wei^{1,2}, FENG Yu-ping^{1,2}, LI Ming-sheng^{1,2}, CUI Meng-nan¹, JIN Dong-wu², LONG Shi-he¹, MA Zhong-ren^{1,2*}

¹College of Life Science and Engineering, Northwest University for Nationalities; ²Gansu Engineering

Research Center for Animal Cell, Lanzhou 730030, China

Abstract: In this study, complex enzyme (pancreatin and neutral protease) hydrolyzed rennet casein was used to prepare lacto-protein hydrolysate. The process was optimized by orthogonal experiments. The effects of promoting cell growth of the lacto-protein hydrolysate were assayed by cultivating BHK and Vero cells. The results showed that the optimal processes of preparing lacto-protein hydrolysate was: pancreatin: neutral protease = 2:1 (mass ratio), 40 ℃, pH 7.0, enzyme/substrate (E/S) = 1:5 (mass ratio), hydrolysis time of 6 h. In the hydrolyzed product, the content of amino nitrogen was determined to be 3.21 g/L, peptide was 35.63 g/L, free amino acids was 14.17 mg/mL, the yield was 40.20%. In the 24 h lacto-protein hydrolysate cultured BHK and Vero cells, the cell densities were 2.0 times to respective blank control, 1.0 and 0.86 times to Hyclone products; In the 48 h lacto-protein hydrolysate cultured BHK and Vero cells, the cell densities were 5.0 times and 4.0 times to respective blank control; and both 0.88 times to Hyclone products. Based these experimental results, it was concluded that the optimal preparation process was simple and short time-consuming; the lacto-protein hydrolysate promoted cell growth for BHK and Vero cells.

Key words: lacto-protein hydrolysate; preparation; cell culture; application

水解乳蛋白是乳蛋白经蛋白酶或肽酶水解的产物,含有丰富的氨基酸和多肽,可为细胞生长提供多种营养成分、贴壁因子及生长因子类似物等^[1],广泛用于生物制药、疫苗、食品等行业。Eagle 等^[2,3]20 世纪 50 年代将水解乳蛋白用于细胞和微生物培养基,随后 Mamoru^[4], Amiot^[5]等分别将水解乳蛋白

用于皮肤、器官等多种细胞的培养。我国学者张尔贤^[6]于 1986 年从原料、酶制剂及产品检测等多个角度探讨了细胞培养用水解乳蛋白的研制过程,这为国内水解乳蛋白的研制奠定了基础。

目前国内水解乳蛋白主要以美国 Hyclone 和 Gibco 产品为主,开发水解乳蛋白在国内具有广阔的市场前景。试验针对传统工艺水解率低,氨基酸破坏程度高,污染环境等缺陷,选取天然牧区凝乳酶干酪素为原料,用复合蛋白酶水解酪蛋白,以多肽含量和氨基酸含量为指标优化酶解工艺,对所得粗制

收稿日期:2013-05-06 接受日期:2013-09-05

基金项目:2010 年甘肃省科技厅支撑计划项目(147);甘肃省农业生物技术研究与开发项目(GNSW-2011-17);中央高校项目(zyz2012088)

* 通讯作者 E-mail: mzm@xbmu.edu.cn

品进行游离氨基酸等一系列检测。最后选取两种常用的动物细胞进行培养,研究其对动物细胞生长的影响,以期细胞培养用水解乳蛋白的大规模生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

凝乳酶干酪素为甘肃省动物细胞工程技术研究中心自制;胰酶由西北民族大学生物工程与技术国家重点实验室提供(胰蛋白酶 1298 U/g;胰淀粉酶 17503 U/g;胰脂肪酶 7200 U/g);中性蛋白酶购自南宁庞博(20 万 U/g);谷胱甘肽标准品购自索莱宝公司。

表 1 正交试验方案

Table 1 Orthogonal experiment design

水平 Level	温度 Temperature (A)	Enzyme/ substrate (B)	pH (C)	胰/中 Pancreatin / Neutral protease (D)
1	40 °C	1:5.0	7.0	2:1
2	45 °C	1:7.5	7.5	4:1
3	50 °C	1:10.0	8.0	6:1

1.3.2 水解乳蛋白的制备

配制 5%^[5] 的酪蛋白水溶液, pH 调至 8.0, 加热至完全溶解, 迅速冷却, 按 $L_9(3^4)$ 正交试验筛选得最优组合控制酶解条件, 反应结束后将反应体系置于沸水浴中维持 10 min, 迅速冷却, 离心取上清喷雾干燥。

喷干条件: 进风温度 180 °C, 出风温度 90 °C, 风速 45 Hz, 流速 200 mL。

1.3.3 蛋白水解液中氨基氮含量测定

氨基氮含量的测定参考甲醛滴定法^[7]。

1.3.4 蛋白水解液多肽含量测定

采用肽键测定法^[8]。所得回归方程: $Y = 0.095X + 0.004, R^2 = 1.0000$ 。

1.3.5 游离氨基酸测定

样品前处理^[9]: 准确移取水解蛋白液于试管中, 加入等体积 5% 的三氯乙酸, 充分震荡摇匀, 3800 rpm 离心 5 min, 除去蛋白, 取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后上机。

色谱条件: 泵 1 (洗脱溶液) 流速: 0.100 mL/min; 泵 2 (茚三酮溶液) 流速: 0.100 mL/min; 分析柱温度: 50 °C; 反应柱温度: 135 °C; 进样体积: 20 μL。

1.3.6 细胞培养试验

配制水解乳蛋白终浓度为 0.2% 含 10% 胎牛血

1.2 仪器与设备

L-8900 氨基酸分析仪(日本日立); SD-1500 喷雾干燥机(上海沃迪科技); BioMate5 紫外分光光度计(美国 Thermo Fisher); SG-2 pH 计(美国 METTLER TOLEDO); HJ-6A 加热搅拌器(常州国华); LC-6M 离心机(上海离心机械研究所); CKX41 显微镜(OLYMPUS)。

1.3 方法

1.3.1 最佳工艺条件的确定

根据复合酶的最佳使用条件并结合单因素试验结果确定各因素适合的酶解范围, 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验, 方案见表 1。

清的 MEM 培养基, 用对应浓度的 Hyclone 产品作为对照, 以 1.0×10^4 /mL 的细胞浓度接种 BHK 和 Vero 细胞于 96 孔板培养。每隔 24 h 观察细胞生长情况, 并计数。

2 结果与分析

2.1 最佳工艺条件的确定

2.1.1 水解时间的确定

试验数据显示不同条件下水解时间对氨基氮含量的影响呈现一定规律性, 结果见图 1。

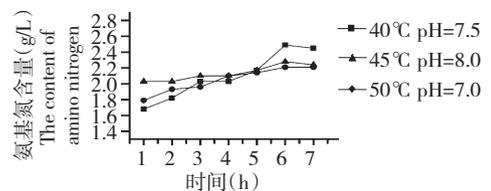


图 1 水解时间对氨基氮的影响

Fig. 1 The influence of hydrolysis time on amino nitrogen content

水解乳蛋白需具有满足细胞生长所需要的多种氨基酸^[6], 而氨基氮含量与游离氨基酸含量成正比。从图 1 可看出, 不同反应条件下, 产物中氨基氮

含量在反应初期缓慢上升,至6 h最大,随后缓慢降低至平稳。这是由于反应初期酪蛋白解聚不彻底,与酶结合较少;一段时间后底物彻底解聚,底物上反

应位点逐渐被酶分子饱和。因此,水解乳蛋白制备的水解时间为6 h。

2.1.2 工艺条件的优化

表2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal experiment

试验号 No.	因素 Factor				氨基氮含量 Content of amino nitrogen (g/L)	多肽含量 Content of polypeptide (g/L)
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	3.22	36.26
2	1	2	2	2	2.67	29.64
3	1	3	3	3	2.45	29.82
4	2	1	2	3	2.94	32.45
5	2	2	3	1	2.69	31.40
6	2	3	1	2	2.56	29.12
7	3	1	3	2	2.79	30.87
8	3	2	1	3	2.52	33.33
9	3	3	2	1	2.60	25.96
以氨基氮含量为指标 Content of amino nitrogen used as calculation index						
K ₁	2.78	2.98	2.77	2.84		
K ₂	2.73	2.63	2.74	2.67		
K ₃	2.64	2.54	2.64	2.64		
R	0.14	0.44	0.13	0.20		
主次顺序 :B > D > A > C						
以多肽含量为指标 Content of polypeptide used as calculation index						
K ₁	32.64	33.93	33.64	31.94		
K ₂	30.99	31.46	29.35	29.88		
K ₃	30.05	28.30	30.70	31.87		
R	2.59	5.63	4.29	2.06		
主次顺序 :B > C > A > D						

2.1.2.1 以氨基氮含量为指标的正交试验结果分析

表2中以氨基氮含量为指标的极差分析显示,各因素影响氨基氮含量的主次顺序为:酶量 > 酶组分 > 温度 > pH,最优组合为 A₁B₁C₁D₁。

2.1.2.2 以多肽含量为指标的正交试验结果分析

由表2以多肽含量为指标的极差分析显示,各因素对多肽含量影响的主次顺序为:酶量 > pH > 温度 > 酶组分,最优组合为 A₁B₁C₁D₁。

综上所述,各因素对两个指标影响的主次顺序略有差异,但对两者影响的最优组合是一致的。因此,复合蛋白酶(胰酶:中性蛋白酶 = 2:1)水解酪蛋白制备水解乳蛋白的最优工艺条件为:40 °C, pH = 7.0, E/S = 1:5 水解6 h。

2.2 对自制水解乳蛋白的检测

按正交试验筛选的最优条件进行不同规模放大验证试验,对产物进行分析,结果如下:

2.2.1 氨基氮及多肽含量测定

表3 不同批次放大验证试验

Table 3 Different batches validation test

酪蛋白重 Weight of casein (g)	水解液体积 Hydrolysate volume (mL)	喷干重 Weight of spraying dry (g)	喷干收率 Yield of spraying dry (%)	氨基氮含量 Content of amino nitrogen (g/L)	多肽含量 Content of polypeptide (g/L)
100	400	42	42	3.10	35.06
500	1940	205	41	3.34	34.89
1000	3600	376	37.6	3.18	36.94

结果表明,在最优条件下,不同规模放大各指标基本稳定,收率(以酪蛋白算)为 40.20%,氨基氮含量平均为 3.21 g/L,多肽含量平均为 35.63 g/L。

2.2.2 氨基酸组分测定

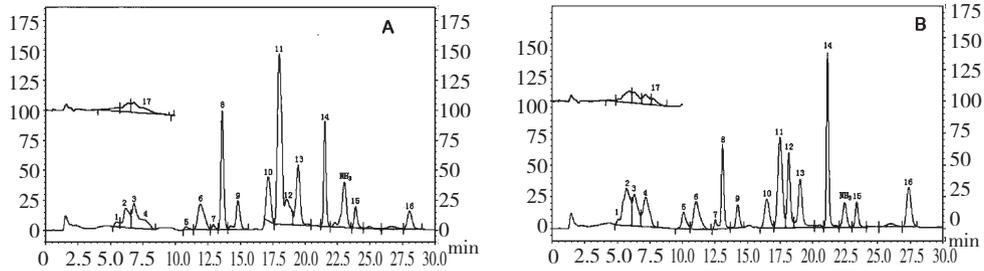


图 2 Hyclone 对照品 (A) 和样品 (B) 的氨基酸色谱图

Fig. 2 Chromatograms of Hyclone standard (A) and sample (B)

注:1. 天门冬氨酸 (Asp); 2. 苏氨酸 (Thr); 3. 丝氨酸 (Ser); 4. 谷氨酸 (Glu); 5. 甘氨酸 (Gly); 6. 丙氨酸 (Ala); 7. 半胱氨酸 (Cys); 8. 缬氨酸 (Val); 9. 蛋氨酸 (Met); 10. 异亮氨酸 (Ile); 11. 亮氨酸 (Leu); 12. 酪氨酸 (Tyr); 13. 苯丙氨酸 (Phe); 14. 赖氨酸 (Lys); 15. 组氨酸 (His); 16. 精氨酸 (Arg); 17. 脯氨酸 (Pro)

在细胞培养过程中使用水解乳蛋白目的是满足细胞生长所需要的多种氨基酸,不仅种类上有要求,而且需要保证各种氨基酸的数量^[10]。由图 2 看出,

自制样品分离效果较好,与 Hyclone 产品基本一致。自制品和对照品均有 17 种常用游离氨基酸,各氨基酸含量有一定的差异,结果见表 4。

表 4 产物氨基酸组成

Table 4 Amino acids composition of the lacto-protein hydrolysate

氨基酸 Amino acid	含量 Content (mg/mL)		保留时间 Retention time (min)		氨基酸 Amino acid	含量 Content (mg/mL)		保留时间 Retention time (min)	
	对照 Standard	样品 Sample	对照 Standard	样品 Sample		对照 Standard	样品 Sample	对照 Standard	样品 Sample
天门冬氨酸 Asp	0.17	0.12	5.480	5.392	异亮氨酸 Ile	1.20	0.76	17.160	16.493
苏氨酸 Thr	0.54	0.29	6.167	5.720	亮氨酸 Leu	3.22	2.23	18.007	17.500
丝氨酸 Ser	0.39	0.64	6.800	6.320	酪氨酸 Tyr	1.21	1.62	18.204	18.180
谷氨酸 Glu	0.29	1.37	7.201	7.173	苯丙氨酸 Phe	1.36	1.46	19.473	19.047
甘氨酸 Gly	0.05	0.20	10.820	10.087	赖氨酸 Lys	1.04	1.90	21.520	21.147
丙氨酸 Ala	0.64	0.62	11.927	11.053	组氨酸 His	0.32	0.46	23.887	23.387
半胱氨酸 Cys	0.14	0.18	12.927	12.896	精氨酸 Arg	0.66	1.32	28.047	27.380
缬氨酸 Val	1.61	1.10	13.593	13.080	脯氨酸 Pro	0.11	0.47	7.356	7.247
蛋氨酸 Met	0.66	0.43	14.820	14.253	氨基酸总量	13.47	14.17		

由表 4 可看出,自制水解乳蛋白中赖氨酸、精氨酸、苯丙氨酸含量高,这与胰酶中胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的专一性有关。其中酸性氨基酸(如谷氨酸、缬氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸等)含量较高,这与酪蛋白有明显酸性是一致的。酪蛋白中超过 55% 的氨基酸有极性基团,而水解产物中极性氨基酸含量均较高。另外,自制水解乳蛋白氨基酸总

量也明显高于对照品,而个别氨基酸却远远低于对照品。这与两者所用原料不同有关。

2.3 水解乳蛋白对细胞生长的影响

通过细胞计数和细胞形态图反应水解乳蛋白对细胞生长的影响,结果如下:

2.3.1 细胞计数

由表 5(细胞计数结果)可看出,细胞培养 24 h

时, BHK 和 Vero 细胞的密度分别为 $4.0 \times 10^4/\text{mL}$ 和 $6.0 \times 10^4/\text{mL}$, 两者均为各自空白的 2.0 倍; 与 Hyclone 产品相比, BHK 和 Vero 细胞的密度分别是 Hyclone 的 1.0 倍和 0.86 倍。48 h 时, BHK 和 Vero 细胞的密度分别为 $1.5 \times 10^5/\text{mL}$ 和 $1.6 \times 10^5/\text{mL}$,

是各自空白的 5.0 倍和 4.0 倍, 与 Hyclone 产品相比, 两细胞密度均是 Hyclone 的 0.88 倍。因此, 添加水解乳蛋白对 BHK 和 Vero 细胞生长有明显的促进作用, 且自制样品和 Hyclone 产品相差明显。

表 5 细胞计数结果

Table 5 Cell count result

组别 Group	BHK				Vero			
	24 h		48 h		24 h		48 h	
	H	Z	H	Z	H	Z	H	Z
空白对照 Blank control	2		3		3		4	
水解乳蛋白 lacto-protein hydrolysate	4	4	17	15	7	6	18	16

注: H: Hyclone 对照样品; Z: 自制样品; 细胞密度数量级均为 $10^4/\text{mL}$

Note: H: Hyclone standard; Z: Prepared lacto-protein hydrolysate; the order of magnitude of cell density was $10^4/\text{mL}$

2.3.2 细胞形态图

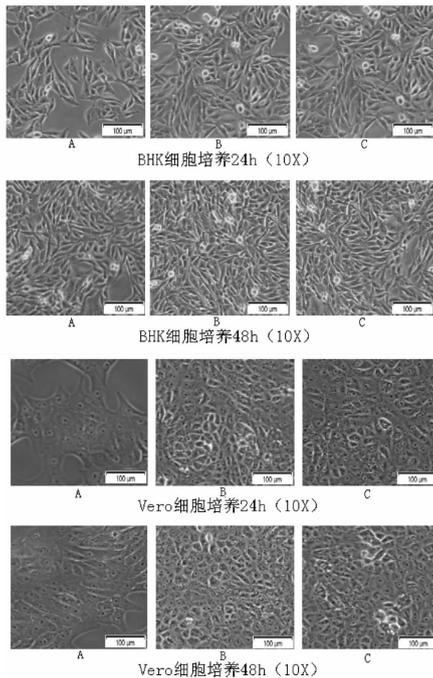


图 3 水解乳蛋白培养 BHK 和 Vero 细胞

Fig. 3 BHK and Vero cells cultured with lacto-protein hydrolysate

注: A 为空白对照; B 为 Hyclone 对照品; C 为样品

Note: A was blank control; B was Hyclone standard; C was lacto-protein hydrolysate

从图 3(细胞整体形态)可看出, 添加水解乳蛋白对 BHK 和 Vero 细胞生长有明显的促进作用。自制水解乳蛋白和 Hyclone 产品差别不明显。这是因为蛋白水解物在一定条件下可提高细胞活力, 促进细胞增殖。

在细胞培养过程中我们发现添加水解乳蛋白浓度过高或过低对细胞增殖的促进作用均有抑制。这是由于浓度过低营养物质未达到最大化; 浓度过高时水解乳蛋白中某种抑制细胞生长的氨基酸浓度过大抑制了细胞的生长, 或者某些氨基酸的浓度过大使培养基的某些环境发生改变, 对细胞的生长产生抑制。

3 结论

水解乳蛋白制备的最优工艺为: 复合蛋白酶(胰酶: 中性蛋白酶 = 2: 1), $40\text{ }^\circ\text{C}$, pH 7.0, E/S = 1: 5(重量比)水解 6 h。在此工艺条件下, 氨基氮含量 3.21 g/L , 多肽含量 35.63 g/L , 喷干收率(以酪蛋白计)达 40.20%。自制水解乳蛋白对两种细胞有明显促进作用, 且与 Hyclone 产品差异不明显。这为细胞培养用水解乳蛋白的大规模生产奠定了基础。

参考文献

- Heidemann R, Zhang C, Qi H, *et al.* The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells. *Cytotechnology*, 2000, 32: 157-167.
- Eagle H. The specific amino acid requirements of mammalian cells (stain L) in tissue culture. *Biol Chem*, 1955, 214: 839-852.
- Eagle H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, 1959, 130: 432-437.
- Mamoru TY, Takesi KS, Seiji KY, *et al.* Milk-protein hydrolysates and compositions for use as hair and skin treating agent. US5314873, 1994-05-24.