

蛋黄蛋白的可控酶解及其产物的促成骨细胞增殖活性

严建刚¹, 喻勤¹, 刘颖², 杜玉兰¹, 谢岚¹, 崔春^{2*}, 毛新亮^{1*}

(1. 完美(广东)日用品有限公司, 广东中山 528400) (2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 脱脂蛋黄粉是蛋黄卵磷脂工业化提取时的产物之一, 其蛋白质及营养价值高, 具有较大的商业利用前景。该文采用胰酶酶解脱脂蛋黄粉, 以钙离子螯合率为主要评价指标, 通过单因素(时间、温度、pH值和酶添加量)试验和响应面优化实验确定最优酶解工艺。同时评估该酶解产物的促 MC3T3-E1 成骨细胞增殖活性, 以期对脱脂蛋黄粉进行高值化利用。结果显示, 胰酶酶解脱脂蛋黄粉的最优工艺为: 酶解时间 3 h, 酶解温度 55 °C, 酶解 pH 值 10.0 和酶添加量 1% 时, 钙离子螯合率 87.12%。在此酶解条件下制备的酶解产物能显著促进 MC3T3-E1 成骨细胞增殖, 在酶解产物质量浓度为 1.00 mg/mL 时, 蛋黄蛋白酶解液的促细胞增殖效果更加明显, 达到空白组细胞数量的 1.20 倍。上述结果表明, 胰酶可以有效酶解脱脂蛋黄粉, 其酶解产物具有高促成骨细胞增殖活性, 为脱脂蛋黄粉高值化利用奠定基础。

关键词: 蛋黄蛋白质; 酶解; 钙离子螯合; 胰酶; 成骨活性

文章编号: 1673-9078(2024)10-165-172

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.10.1101

Controlled Enzymatic Hydrolysis of Egg Yolk Protein and the Pro-osteoblast Proliferative Activity of the Resulting Hydrolysate

YAN Jiangan¹, YU Qin¹, LIU Ying², DU Yulan¹, XIE Lan¹, CUI Chun^{2*}, MAO Xinliang^{1*}

(1. Perfect (Guangdong) Commodity Co. Ltd., Zhongshan 528400, China) (2. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Defatted egg yolk powder is as a byproduct of the industrial extraction of egg yolk lecithin. This protein- and nutrient-rich product appears to be commercially valuable. To optimize enzymatic hydrolysis, defatted egg yolk powder samples were hydrolyzed using trypsin, with calcium chelating capacity serving as the primary evaluation index. The optimum hydrolysis conditions were identified by coupling unidirectional analysis (involving variables like hydrolysis duration, temperature, pH, and enzyme dosage) to response surface optimization. The pro-proliferative activity of the resulting hydrolysate in the context of MC3T3-E1 osteoblasts was assessed to enable the high-value application of defatted egg yolk powder. The results indicated that under optimum conditions, i.e., hydrolysis duration, 3 h; temperature, 55 °C; pH,

引文格式:

严建刚, 喻勤, 刘颖, 等. 蛋黄蛋白的可控酶解及其产物的促成骨细胞增殖活性[J]. 现代食品科技, 2024, 40(10): 165-172.

YAN Jiangan, YU Qin, LIU Ying, et al. Controlled enzymatic hydrolysis of egg yolk protein and the pro-osteoblast proliferative activity of the resulting hydrolysate [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(10): 165-172.

收稿日期: 2023-09-14

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31201416)

作者简介: 严建刚 (1978-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: yjg78228@perfect99.com

通讯作者: 崔春 (1978-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: cuichun@scut.edu.cn; 共同通讯作者: 毛新亮 (1982-), 男, 博士, 研究方向: 分子医学, E-mail: yfzx02@perfect99.com

10.0; enzyme dosage, 1%, the calcium chelating capacity reached 87.12%. The hydrolysate produced under these conditions markedly enhanced the proliferation of MC3T3-E1 osteoblasts. This enhancement was most pronounced at a hydrolysate concentration of 1.00 mg/mL, where the proliferation of the treatment group osteoblasts was more than that of the blank group osteoblasts (by 1.20 times). The findings of this study reveal that the trypsin-facilitated enzymatic hydrolysis of defatted egg yolk powder effectively produces hydrolysates with considerable pro-osteoblast proliferative activity, thereby supporting the high-value application of defatted egg yolk powder.

Key words: egg yolk protein; enzymatic hydrolysis; calcium chelation; trypsin; osteogenic activity

当今世界进入老龄化阶段,且老龄人口逐年增多,因此骨质疏松症的发病率逐年上升,其特点是骨矿物质密度低和骨组织微结构退化^[1,2]。据报道,全球约有2亿名患者正在接受治疗^[3]。目前,成骨细胞和骨基质再生药物(双磷酸盐、雌激素受体调节剂、钙剂和他汀类等)是治疗骨质疏松症的主要药物,但是长期服用此类药物会存在一些副作用,如眼部炎症、肾脏损伤和心脏病发作等^[4,5]。因此,开发具有较小副作用的新型治疗剂逐渐成为研究热点。近年来,多种生物活性蛋白和肽被报道具有成骨活性及预防骨质疏松症效果,如金枪鱼骨胶原肽,鸭蛋清肽、蓝贻贝十二肽、牛乳铁蛋白和卵黄高磷蛋白等^[6-10]。此外,由于钙离子是调控骨形成及增加骨密度重要的矿物质,钙离子螯合物的研究也受到广泛关注^[11]。

脱脂蛋黄粉是工业生产卵磷脂的副产物^[12]。近年来,随着卵磷脂生产量的不断扩大,此副产物在工业生产中不断累积,并作为动物饲料或直接作为废弃物被大量丢弃,造成资源浪费和环境污染。诸多研究报道蛋黄蛋白质是一类优质蛋白质,氨基酸配比均衡,营养价值高^[13,14]。蛋黄蛋白质中含有大量磷酸基团,具有较好的金属螯合能力^[15]。此外,近期已有多项研究表明,蛋黄肽具有多种生理活性,如抗菌、降血压、降血脂和促进骨骼生长活性等^[16]。本文以脱脂蛋黄粉为原料,采用胰酶对其进行酶解,以钙离子螯合率为主要评价指标,通过单因素试验和响应面优化实验得到最优酶解工艺。随后,对酶解产物的促MC3T3-E1成骨细胞增殖活性进行评估。本研究旨在开发蛋黄肽作为钙补充剂和骨生长调节剂,实现对脱脂蛋黄粉的回收再利用,具有较为深远的现实意义和经济价值。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

脱脂蛋黄,广州市影珠生物科技有限公司;胰酶(10 U/mg),广西南宁东恒华道生物有限公司;

MC3T3-E1成骨细胞,上海北纳生物有限公司;氢氧化钠、浓盐酸、浓硫酸、苯酚、乙醚、无水乙醇、甲醛、氯化钙、乙二胺四乙酸二钠、硼酸,天津福晨化学试剂有限公司;DMEM培养基、胎牛血清、胰酶-EDTA、青霉素-链霉素双抗,Gibco公司;MTT试剂盒,碧云天生物技术有限公司。

凯氏定氮仪(KDN-103F),上海始恒仪器设备有限公司;消化炉(HYP-308),常州德杜精密仪器有限公司;高速冷冻离心机(GL-21M),长沙湘仪离心机仪器有限公司;SCIENTZ-18N,浙江赛德仪器设备有限公司;恒温振荡器(THZ-82),杭州虹约精密仪器制造有限公司;CO₂培养箱,赛默飞科技有限公司;倒置显微镜(CKX41),Olympus有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 脱脂蛋黄粉基本组分的测定

脱脂蛋黄粉蛋白质、总糖、脂肪、灰分和水分的测定分别采用凯氏定氮法(GB 5009.5-2016)、苯酚硫酸法(DB12/T 847-2018)、索氏抽提法(GB 5009.6-2016)、灼烧法(GB 5009.4-2016)和直接干燥法(GB 5009.3-2016)。

1.2.2 蛋黄蛋白酶解液的制备

准确称取脱脂蛋黄粉10 g分散于90 mL蒸馏水中,1 mol/L NaOH调节pH值至7.0,加入蛋白酶,放入水浴摇床中震荡酶解3 h,分别测定水解度、蛋白回收率和钙离子螯合率。在蛋白酶筛选实验中,采用了AB8000、AY50C、37071、木瓜蛋白酶、胰酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶、AB7089、复合蛋白酶、菠萝蛋白酶、酸性蛋白酶和嗜热菌蛋白酶等12种蛋白酶对蛋黄蛋白进行酶解,酶解条件(pH值、时间、温度和加酶量)分别采用购买酶制剂外包装上所标的最适条件。

1.2.3 水解度和蛋白回收率的测定

蛋白质水解度是指蛋白酶解上清液中氨氮含量与酶解体系总氮含量的比值^[17]。酶解上清液中氨氮

含量的测定采用甲醛滴定法^[18], 总氮含量的测定采用凯氏定氮法, 水解度和蛋白回收率根据以下公式(1)和(2)进行计算:

$$B = \frac{N_1}{N_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

B —水解度(DH), %;

N_1 —酶解上清液中的氮含量;

N_2 —酶解体系中的总氮含量。

$$D = \frac{m_1 \times N_3}{m_2 \times N_4} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

D —蛋白回收率(PR), %;

m_1 —酶解上清液的质量;

N_3 —酶解上清液的总氮含量;

m_2 —酶解体系中加入蛋黄粉的总质量;

N_4 —脱脂蛋黄粉的含氮量。

1.2.4 钙离子螯合工艺及钙离子螯合率的测定

准确称取 5 mL 酶解液, 1 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.0, 加入 0.5 mL CaCl_2 (30 mg/mL), 放入 60 °C 空气摇床中充分反应 40 min, 待反应结束后, 1:8 (V/V) 加入无水乙醇, 静置 1 h, 离心 10 min (9 000 r/min), 取上清。参考 GB 5009.92-2016 测定上清液中钙离子含量^[19], 钙离子螯合率根据公式(3)进行计算:

$$C = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

C —钙离子螯合率, %;

m_1 —钙离子总添加量;

m_2 —上清液中钙离子总量。

1.2.5 蛋黄蛋白酶解工艺单因素试验

在蛋黄蛋白酶解工艺优化中, 以酶解时间、温度、pH 值和酶添加量为变量, 以钙离子螯合率为主要评价指标, 水解度和蛋白回收率为辅助评价指标进行单因素试验, 试验设计如下表 1 所示^[20]。

1.2.6 响应面优化蛋黄蛋白酶解工艺

以钙离子螯合率为响应值, 酶解时间、温度和 pH 值对变量因素, 采用响应面实验对蛋黄蛋白的酶解工艺进行优化, 根据 Box-Behnken 中心组合设计原理, 设计三因素三水平响应面实验, 因素水平表如下表 2 所示^[21]。

表 1 单因素试验设计表

Table 1 The experimental design of single factor

变量	定量	测定指标
酶解时间: 0、3、6、12、24 h	温度 55 °C、pH 值 10、酶添加量 1%	钙离子螯合率 水解度 蛋白回收率
酶解温度: 25、37、55、65、75 °C	时间 3 h、pH 值 10、酶添加量 1%	
酶解 pH 值: 3、5、7、8、10、11、12、13	时间 3 h、温度 55 °C、酶添加量 1%	
酶添加量: 0.2%、0.6%、1.0%、1.4%、1.8%	时间 3 h、温度 55 °C、pH 值 10	

表 2 响应面因素水平表

Table 2 List of factors and levels of response surface analysis

因素	编码	编码水平		
		-1	0	1
时间/h	A	2	3	4
温度/°C	B	45	55	65
pH 值	C	9	10	11

1.2.7 成骨细胞增殖率

成骨细胞增殖率的测定采用 MTT 法。取处于对数生长的成骨细胞, 将细胞消化重悬并计数, 以每孔 5 000 个的密度接种于 96 孔板中, 于培养箱中培养 24 h, 待细胞融合度达到 90% 后, 将细胞培养基更换为含有不同浓度蛋黄蛋白酶解液的完全培养基继续培养成骨细胞, 所有组别均设 6 个平行。在更换培养液后继续培养 24 h, 吸去上清液, PBS 清洗两次, 每孔加入 50 μL MTT 溶液, 继续于培养箱中培养 4 h, 吸取孔板中的液体, 每孔加入 150 μL DMSO, 适当混匀, 在 570 nm 处测定各孔的吸光度, 每组实验均进行 6 次重复, 按照以下公式计算细胞增殖率:

$$E = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

E —细胞增殖率, %;

A_1 —样品组吸光值;

A_0 —空白组吸光值;

A_2 —对照组吸光值。

1.3 数据分析

实验重复三次, 采用 SPSS 17.0 和 Origin 2021 软件进行数据统计分析 ($P < 0.05$) 和作图, 实验结果以“平均值 \pm 标准差”的形式表示。

表 3 脱脂蛋黄粉的基本组成 (%)

Table 3 The proximate composition of defatted egg yolk powder

原料	蛋白质	总糖	脂肪	灰分	水分
脱脂蛋黄粉	80.01 ± 0.19	0.25 ± 0.02	4.96 ± 0.12	4.79 ± 1.02	4.92 ± 0.56

2 结果与分析

2.1 脱脂蛋黄粉的基本组分

脱脂蛋黄粉的基本组成如表 3 所示。从表中可以看出，脱脂蛋黄粉中含有丰富的营养物质，其中蛋白质含量高达 80.01%，表明其可作为良好的蛋白质资源被进一步加工利用。

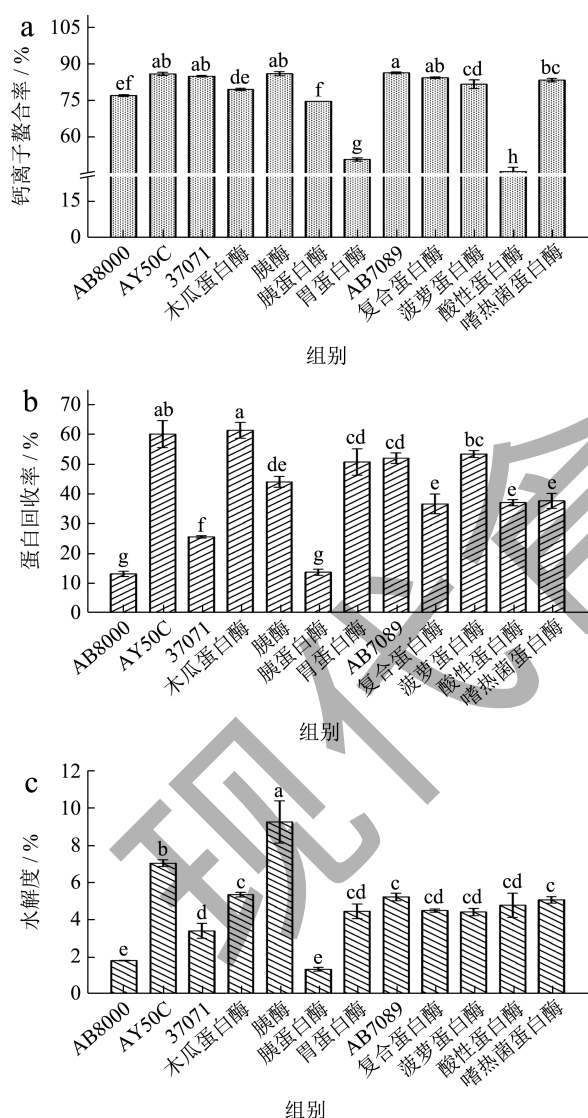


图 1 酶的种类对酶解液水解度、蛋白回收率和钙离子螯合率的影响

Fig.1 Effect of different enzyme on degree of hydrolysis, protein recovery and calcium chelating ability of hydrolysate

注：图中字母表示组间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。下图同。

2.2 蛋白酶的筛选

本研究采用胰酶、AY50C 碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶等 12 种酶对蛋黄蛋白进行酶解，并测定酶解液钙离子螯合率、水解度和蛋白回收率，结果如图 1 所示。

从图 1 中可以看出，采用不同蛋白酶进行酶解之后，不同酶解液的水解度、蛋白回收率和钙离子螯合率差别较大。对于钙离子螯合率和水解度而言，经胰酶酶解得到的酶解液中钙离子螯合率和水解度较高，分别为 85.94% 和 9.25%；对于蛋白回收率而言，经木瓜蛋白酶酶解后得到的酶解液蛋白回收率最高，其次是碱性蛋白酶 AY50C。上述结果是因为酶具有底物专一性，不同的蛋白酶会切断蛋白序列中不同位点，产生具有不同氨基酸序列和肽链长度的肽段^[22]。由于胰酶酶解产物的钙离子螯合率最高，因此本研究选择胰酶进行后续的实验。

2.3 单因素试验结果

诸多研究表明，酶解条件如酶解时间、温度、pH 值和酶添加量等会显著影响蛋白质的酶解效果。因此在本实验中，分别在上述不同试验条件下采用胰酶对蛋黄蛋白进行酶解，以钙离子螯合率为主要评价指标，水解度和蛋白回收率为辅助评价指标来探究蛋黄蛋白的最优酶解工艺。

2.3.1 酶解时间对蛋黄蛋白酶解效果的影响

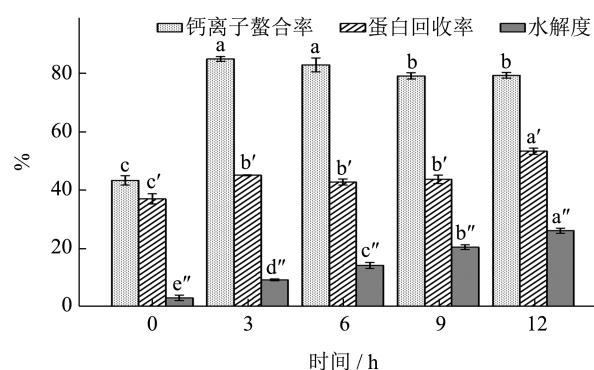


图 2 酶解时间对蛋黄蛋白酶解效果的影响

Fig.2 Effect of different time on the egg yolk protein hydrolysate

如图2所示,随着酶解时间的增加,蛋黄蛋白酶解液的水解度和蛋白回收率均呈显著升高的趋势,而钙离子螯合率呈现出先升高后下降的趋势。这可能是因为在酶解过程中钙离子结合位点的不断变化,起初较多的氨基酸残基及侧链基团暴露使得酶解物的亚铁离子螯合率有所增加,而后酶解物中的多肽也不断被降解成小分子多肽及氨基酸导致钙离子螯合度下降^[23]。在酶解3 h条件下,酶解液的钙离子螯合率达到最高,为84.8%。因此,本研究选择3 h进行后续试验。

2.3.2 酶解温度对蛋黄蛋白酶解效果的影响

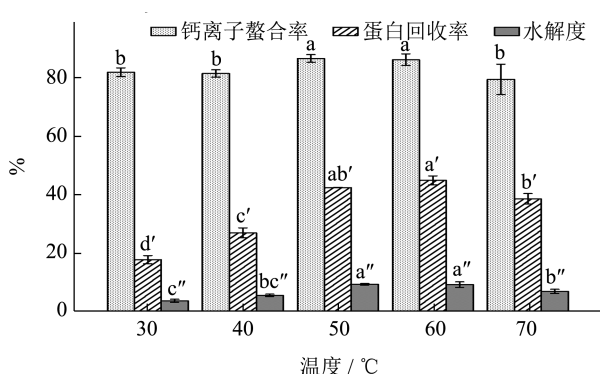


图3 酶解温度对蛋黄蛋白酶解效果的影响

Fig.3 Effect of different temperature on the egg yolk protein hydrolysate

不同酶解温度条件下,蛋黄蛋白酶解液的水解度、蛋白回收率和钙离子螯合率如图3所示。从图3中可以看出,随着温度的提高,酶解液水解度、蛋白回收率和钙离子螯合率均先升高后下降,并在温度为50 °C时,三者均达到最高。这是由于温度较低时,酶的活性也较低,随着温度继续升高,并达到酶的最适温度时,胰酶的活性达到最佳状态,当温度继续升高时,过高的温度对酶产生了变性作用,酶活受到抑制,因此钙离子螯合率、水解度和蛋白回收率开始出现下降趋势^[24]。钙离子螯合率在50 °C条件下达到最高值。因此,本研究选择50 °C进行后续试验。

2.3.3 酶解pH值对蛋黄蛋白酶解效果的影响

酶解pH值是影响酶解效果的关键因素之一。图4显示了蛋黄蛋白在不同pH值条件下酶解后,酶解液的水解度、蛋白回收率和钙离子螯合率。如图4所示,随着pH值的逐渐升高,水解度、蛋白回收率和钙离子螯合率在整体上均呈现先上升后下降的趋势,且均在pH值10时,达到最高值。这是

因为胰酶在其最适pH范围内可最高效率地促进酶的活性部位与底物结合,将底物进一步分解为小分子多肽及氨基酸,而其他pH值条件下,胰酶的酶解活性将会降低^[25]。因此,结合实际工业生产,本研究选择pH值为10进行后续试验。

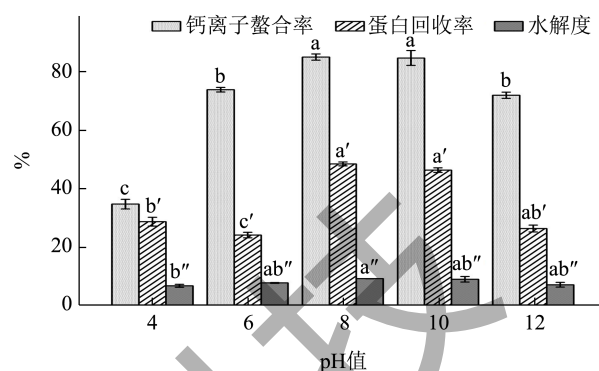


图4 酶解pH值对蛋黄蛋白酶解效果的影响

Fig.4 Effect of different pH value on the egg yolk protein hydrolysate

2.3.4 酶添加量对蛋黄蛋白酶解效果的影响

如图5所示,蛋黄蛋白酶解液的水解度和蛋白回收率随着胰酶添加量的增加而逐渐增加。而随着酶添加量的增加,钙离子螯合率呈现出先上升后下降的趋势,在酶添加量为1%的条件下,其钙离子螯合率达到最大(85.39%)。这可能是由于随着酶添加量的不断增加,酶的活性位点与底物不断结合并将蛋白切割为小分子肽段,暴露出其钙离子结合位点,而随着蛋白酶的持续增加,过量的蛋白酶可能会导致蛋黄蛋白释放出更多小分子游离氨基酸,从而导致蛋白酶酶解产物钙离子螯合能力的下降,而整个过程中可溶性肽和氨基酸不断释放导致蛋白回收率和水解度的持续增加^[26]。因此,在采用胰酶对蛋黄蛋白进行酶解时,选择酶添加量为1%。

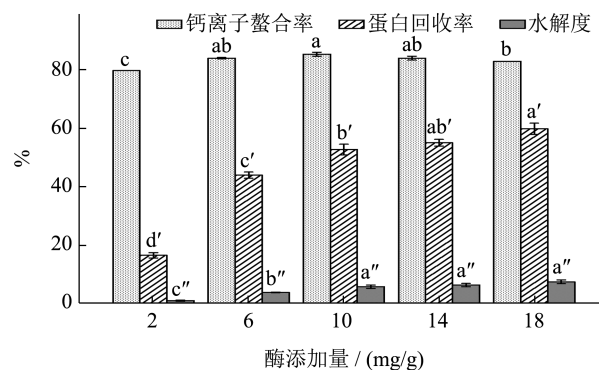


图5 酶添加量对蛋黄蛋白酶解效果的影响

Fig.5 Effect of different enzyme concentration on the egg yolk protein hydrolysate

2.4 响应面分析

综合上述单因素试验结果可以得出, 酶解时间、温度和 pH 值对蛋黄蛋白酶解液钙离子螯合率的影响较大, 为得到最佳酶解工艺, 选取上述三个因素进行进一步响应面分析。虽然不同酶添加量也会显著影响酶解液钙离子螯合率, 但在实际工厂生产中, 1% 酶添加量已会产生较高生产成本, 因此综合考虑经济效益, 本研究选择 1% 酶添加量进行后续试验, 而不再对此因素进行进一步响应面优化分析。

2.4.1 Box-Behnken 实验设计及结果

以钙离子螯合率 (Y) 为响应值, 酶解时间 (A)、酶解温度 (B) 和酶解 pH 值 (C) 为变量因素进行响应面实验, 实验设计及结果如表 4 所示。

表 4 Box-Behnken 实验设计及结果

Table 4 Box-Behnken design arrangement and experimental results

序号	A 酶解时间 /h	B 酶解温度 /°C	C 酶解 pH 值	Y 钙离子螯合率/%
1	-1	0	1	81.6
2	0	0	0	87.1
3	0	0	0	87.5
4	-1	-1	0	79.8
5	1	0	-1	80.1
6	0	0	0	87.5
7	1	1	0	85.3
8	0	-1	-1	79.2
9	0	1	-1	79.5
10	0	1	1	86
11	0	0	0	87.2
12	-1	0	-1	79.3
13	1	0	1	86.2
14	1	-1	0	85.2
15	0	-1	1	84.1
16	0	0	0	87.9
17	-1	1	0	83

2.4.2 模型的建立及显著性分析

本研究采用 Design Expert 13.0 软件进行数据分析, 得到变量因素 A、B 和 C 与响应值 Y 的回归方程为: $Y=87.44+1.64A+0.6875B+2.48C-$

$0.775AB+0.95AC+0.4BC-2.26A^2-1.86B^2-3.38C^2$, 该回归模型的方差分析如下表 5 所示。

表 5 回归方程方差分析表

Table 5 ANOVA for response surface regression model

方差来源	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值	显著性
模型	174.07	9	19.34	58.12	<0.000 1	**
A	21.45	1	21.45	64.46	<0.000 1	**
B	3.78	1	3.78	11.36	0.011 9	*
C	49.00	1	49.00	147.26	<0.000 1	**
AB	2.40	1	2.40	7.22	0.031 2	*
AC	3.61	1	3.61	10.85	0.013 2	*
BC	0.640 0	1	0.640 0	1.92	0.208 1	
A ²	21.46	1	21.46	64.48	<0.000 1	**
B ²	14.53	1	14.53	43.65	0.000 3	**
C ²	48.17	1	48.17	144.76	<0.000 1	**
残差	2.33	7	0.332 8			
失拟项	1.94	3	0.645 8	6.59	0.050 0	Not significant
纯误差	0.392 0	4	0.098 0			
总和	176.40	16				

$R^2=0.986 8, R_{adj}^2=0.969 8, C.V.=0.687 5$

注: ** 代表极显著水平 ($P<0.01$), * 代表显著水平 ($P<0.05$)。

如表 5 所示, 回归方程 $P<0.000 1$, 说明该模型达到极显著水平, 失拟项不显著, 说明该模型拟合程度较好, 回归系数 $R^2=0.986 8$, 说明实际数据与模型数据较为相符。

2.4.3 蛋黄蛋白酶解工艺的响应面分析

图 6 表示钙离子螯合率的 2D 模型曲线^[27]。综合图 6 和表 5 可以看出, 酶解时间、温度和 pH 值均显著影响酶解液的钙离子螯合率, 且影响效果由高到低依次为: C (pH 值) > A (酶解时间) > B (酶解温度), 且酶解时间和温度以及酶解时间和 pH 值之间的交互作用对钙离子螯合率有显著影响。

由回归方程分析可得, 蛋黄蛋白最佳酶解条件为: 酶解时间 3.34 h, 酶解温度为 53.53 °C 和酶解 pH 值为 10.42, 此时经回归模型方程计算得到最高钙离子螯合率为 87.98%。根据此优化条件进行 3 次平行验证实验, 得到实际钙离子螯合率为 87.12%, 模型预测值与实际值之间差异小于 5%, 表明响应面优化得到的最优酶解工艺可靠。

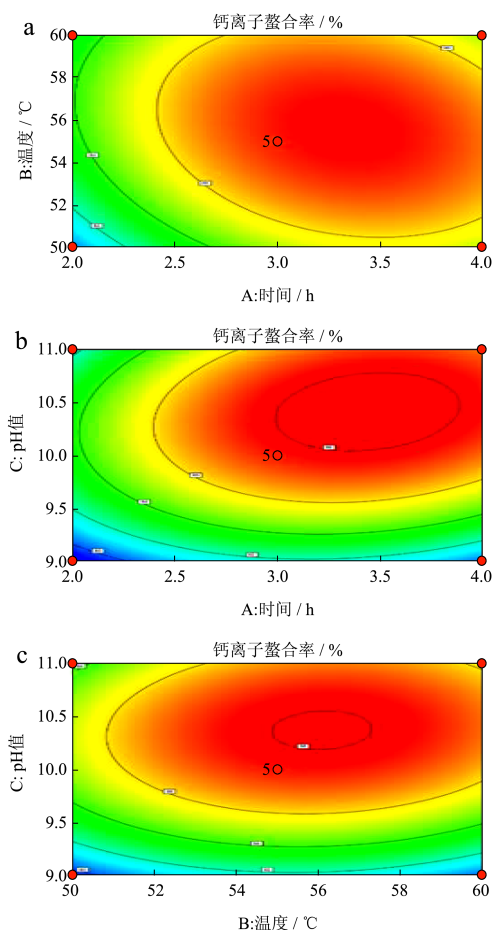


图 6 因素间相互作用对钙离子螯合率的影响

Fig.6 Effect of parameters on the calcium chelating ability

2.5 细胞增殖

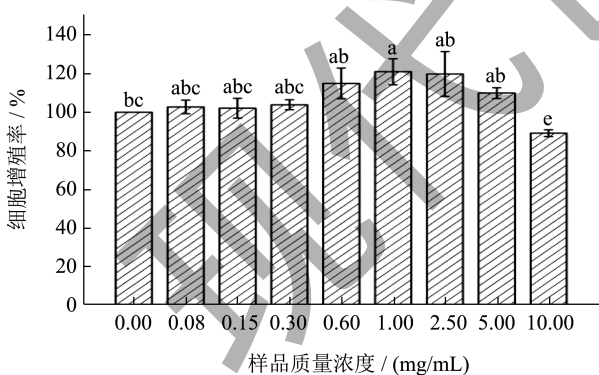


图 7 不同浓度蛋黄蛋白酶解液对 MC3T3-E1 成骨细胞促增殖效果

Fig.7 Effect of various concentration of egg yolk protein hydrolysate on proliferation in MC3T3-E1 cells

成骨细胞主要是由内外骨膜中基质内的间充质始祖细胞分化而来，能特异性分泌多种生物活性物质，是调节骨形成和重建的重要细胞之一^[28,29]。如图 7 所示，与空白组相比，0.08~5.00 mg/mL 的蛋黄蛋白酶解物处理对成骨细胞增殖均不存在抑制作

用，在蛋白质量浓度为 1.00 mg/mL 时，蛋黄蛋白酶解物可以显著 ($P<0.05$) 促进成骨细胞的增殖，促增殖率分别为 120.97%。但是，当样品蛋白质量浓度达到 10.00 mg/mL 时，蛋黄蛋白酶解物处理均显著 ($P<0.05$) 降低了活细胞群，表明高质量浓度处理抑制了细胞的增殖。上述结果表明，在蛋白质量浓度为 1.00 mg/mL 的剂量处理对成骨细胞具有显著促增殖效果，其成骨细胞形态图如 8 所示。以上结果说明，本研究中制备的蛋黄蛋白酶解液促成骨细胞增殖活性，具有开发为具有缓解骨质疏松疾病保健产品的潜力^[30,31]。李娜等^[32]研究发现，鹿茸胶原酶解物 (0.3 g/L) 能显著促进 MC3T3-E1 细胞的增殖。

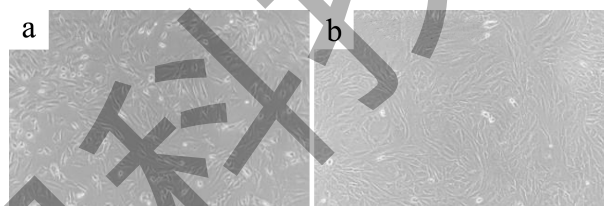


图 8 MC3T3-E1 成骨细胞形态图

Fig.8 MC3T3-E1 osteoblast morphology map (20×)

注: a 为空白组, b 为样品组 1 000 µg/mL。

3 结论

本研究采用胰酶酶解蛋黄蛋白，以钙离子为主要评价指标，结合单因素试验和响应面优化实验确定了酶解蛋黄蛋白的最优酶解工艺为：酶解时间为 3 h，酶解温度为 50 °C，酶解 pH 值为 10.0 和酶添加量为 1%，经验证得出此时钙离子螯合率为 87.12%。同时评估了最优酶解工艺下制备得到的酶解产物促 MC3T3-E1 成骨细胞增殖活性，结果显示：1.00 mg/mL 的蛋黄蛋白酶解液能显著促进 MC3T3-E1 成骨细胞的增殖。该研究为脱脂蛋黄粉的开发利用提供了理论指导意义。

参考文献

[1] BAO X, SONG M, ZHANG J, et al. Calcium-binding ability of soy protein hydrolysates [J]. Chinese Chemical Letters, 2007, 18(9): 1115-1118.

[2] WANG Z, WANG K, FENG Y, et al. Preparation, characterization of L-aspartic acid chelated calcium from oyster shell source and its calcium supplementation effect in rats [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 75: 104249.

[3] YE M L, ZHANG C H, ZHU L Y, et al. Yak (*Bos grunniens*) bones collagen-derived peptides stimulate osteoblastic proliferation and differentiation via the activation

- of Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100: 2600-2609.
- [4] CHAKHTOURA M, CHAMOUN N, RAHME M, et al. Impact of vitamin D supplementation on falls and fractures -A critical appraisal of the quality of the evidence and an overview of the available guidelines [J]. Bone, 2020, 131: 115112.
- [5] MERLOTTI D, FALCHETTI A, CHIODINI I, et al. Efficacy and safety of abaloparatide for the treatment of post-menopausal osteoporosis [J]. Expert Opinion on pH Value Armacotherapy, 2019, 20(7): 805-811.
- [6] HOU T, LIU W W, SHI W, et al. Desalted duck egg white peptides promote calcium uptake by counteracting the adverse effects of phytic acid [J]. Food Chemistry, 2017, 219: 428-435.
- [7] WANG J, ZHANG B, LU W, et al. Cell proliferation stimulation ability and osteogenic activity of low molecular weight peptides derived from bovine gelatin hydrolysates [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68: 7630-7640.
- [8] GUO D, LIU W, ZHANG X, et al. Duck egg white-derived peptide VSEE (Val-Ser-Glu-Glu) regulates bone and lipid metabolisms by Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway and Intestinal Microbiota [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2019, 63: 1900525.
- [9] XU Z, CHEN H, FAN F, et al. Bone formation activity of an osteogenic dodecapeptide from blue mussels (*Mytilus edulis*) [J]. Food & Function, 2019, 10: 5616.
- [10] REDDI S, SANUSI BELLO MADA1 N K, KUMARI R, et al. Antiosteopenic effect of buffalo milk casein-derived peptide (NAVPIPTL) in ovariectomized rats [J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2019, 25: 1147-1158.
- [11] JIN F, WANG Y P, TANG H K, et al. Limited hydrolysis of dehulled walnut (*Juglans regia* L.) proteins using trypsin: Functional properties and structural characteristics [J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 133: 110035.
- [12] MARCET I, SAEZ-ORVIZ S, RENDUELES M, et al. Egg yolk granules and pH value osvitin. Recent advances in food technology and applications [J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 153: 112442.
- [13] 王宁.鸡蛋LDL结构、脂质组分析及对小鼠血脂代谢的影响研究[D].武汉:华中农业大学,2018.
- [14] MARCET I, DELGADO J, DIAZ N, et al. Peptides recovery from egg yolk lipovitellins by ultrafiltration and their in silico bioactivity analysis [J]. Food Chemistry, 2022, 379: 132145.
- [15] CHALAMAIAH M, ESPARZA Y, HONG H, et al. pH value ysisicochemical and functional properties of leftover egg yolk granules after pH osvitin extraction [J]. Food Chemistry, 2018, 268: 369-377.
- [16] 介怡琳.卵黄高磷蛋白调控骨矿化的功能研究[D].武汉:华中农业大学,2017.
- [17] XIANG H, HUANG H, SUN-WATERHOUSEBD D, et al. Enzymatically synthesized γ -[Glu](n \geq 1)-Gln as novel calcium-binding peptides to deliver calcium with enhanced bioavailability [J]. Food Chemistry, 2022, 387: 132918.
- [18] 邹晶.超声-TG酶交联改性对小麦面筋蛋白及酵母协同酶解特性研究[D].广州:华南理工大学,2018.
- [19] MALISON A, ARPANUTUD P, KEERATIPIBUL S. Chicken foot broth byproduct: A new source for highly effective peptide-calcium chelate [J]. Food Chemistry, 2021, 345: 128713.
- [20] 吴洁,王娟,徐格,等.响应面法优化百香果茶油辣椒酱加工工艺[J].中国调味品,2022,47(7):120-124.
- [21] 金萍,刘政,于小磊.响应面法优化苹果胡萝卜果蔬汁发酵乳饮料[J].食品工业,2022,43(8):127-131.
- [22] HUANG W, LAN Y Q, LIAO W W, et al. Preparation, characterization and biological activities of egg white peptides-calcium chelate [J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 149: 112035.
- [23] 汪卓.蛋黄蛋白亚铁螯合肽的制备及螯合特性研究[D].广州:华南理工大学,2021.
- [24] NJ A, EC R. Characterization of casein pH osphopeptides prepared using alcalase: Determination of enzyme specificity [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1996, 19(3): 202-207.
- [25] 唐润梅. γ -[Glu](n(1-5)-Gln的酶法合成及其应用研究[D].广州:华南理工大学,2020.
- [26] 陶欣然.燕麦奶的开发、功能性及货架期研究[D].武汉:华中农业大学,2022.
- [27] FANG S X, RUAN G R, HAO J, et al. Characterization and antioxidant properties of Manchurian walnut meal hydrolysates after calcium chelation [J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 130: 109632.
- [28] 郭丹郡.基于CaSR及Wnt/ β -catenin信号通路的鸭蛋蛋清肽促钙吸收及促骨合成活性及机制研究[D].武汉:华中农业大学,2020.
- [29] LIU L, WANG D, QIN Y, et al. Astragalin promotes osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells and bone formation *in vivo* [J]. Frontiers in Endocrinology, 2019, 10(228): 1-12.
- [30] WEI W, LIU S, SONG J, et al. MGF-19E peptide promoted proliferation, differentiation and mineralization of MC3T3-E1 cell and promoted bone defect healing [J]. Gene, 2020, 749: 144703.
- [31] TOOSI S, BEHRAVAN J. Osteogenesis and bone remodeling: A focus on growth factors and bioactive peptides [J]. BioFactors, 2019, 46: 326-340.
- [32] 李娜,王继凤,兰兴成,等.鹿茸胶原酶解物对地塞米松诱导成骨细胞MC3T3-E1凋亡的保护作用[J].中国药理学与毒理学杂志,2019,33(10):832.