

不同分子量抗骨质疏松驴骨肽的制备工艺

刘楚怡^{1,2}, 樊雨梅³, 王长伟¹, 梅娜娜³, 杜芬¹, 王东亮^{3*}

(1. 青岛海洋生物医药研究院, 山东青岛 266001; 2. 中国海洋大学, 山东青岛 266073; 3. 东阿阿胶股份有限公司, 山东聊城 252200)

摘要 [目的]探索制备不同分子量驴骨肽的工艺,并通过细胞试验对其抗骨质疏松活性进行研究。[方法]以驴骨粉为原料,酶法制备不同分子量驴骨肽,通过单因素及响应面优化得到最佳酶解条件,并考察其对成骨细胞 MG-63 中碱性磷酸酶活性的影响,确定具有抗骨质疏松活性的不同分子量驴骨肽的制备方法。[结果]确定了平均分子量为 3 315 Da 和 797 Da 的驴骨肽的制备方法,可使成骨细胞的碱性磷酸酶活性分别增加 9.84% 和 9.83%。[结论]该研究确定了小于 3 kD 和大于 3 kD 这 2 个分子量段中具有最佳抗骨质疏松活性的驴骨肽的制备方法。

关键词 驴骨肽;分子量;抗骨质疏松活性;细胞试验

中图分类号 TS 218 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)17-0155-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.17.045



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Preparation of Different Molecular Weight Anti-osteoporotic Donkey Bone Peptide

LIU Chu-yi^{1,2}, FAN Yu-mei³, WANG Chang-wei¹ et al (1. Marine Biomedical Research Institute of Qingdao, Qingdao, Shandong 266001; 2. Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266073; 3. Dong'e Ejiao Co., Ltd., Liaocheng, Shandong 252200)

Abstract [Objective] To explore the preparation of different molecular weight donkey bone peptides and to study anti-osteoporosis activities by cell experiments. [Method] The donkey bone powder was used as raw material to prepare donkey bone peptides with different molecular weight. The optimal enzymatic hydrolysis conditions were optimized by single factor and response surface, and the effect on alkaline phosphatase activity of osteoblast MG-63 was determined. To study the method for preparing different molecular weight donkey bone peptides against osteoporosis activity. [Result] Through the present study, the preparation methods of two molecular weight donkey bone peptides with average molecular weights of 3 315 Da and 797 Da were determined, and the alkaline phosphatase activities of osteoblasts were increased by 9.84% and 9.83%, respectively. [Conclusion] This study identified a method for the preparation of donkey bone peptides with optimal anti-osteoporosis activity in two molecular weight segments less than 3 kD and greater than 3 kD.

Key words Donkey bone peptide; Molecular weight; Anti-osteoporosis activity; Cell experiment

驴在我国具有悠久的饲养历史,资源丰富。以驴皮为基本原料制作的阿胶,具有滋阴养血、补肺润燥、止血安胎的疗效,是久负盛誉的滋补药^[1]。然而,除驴皮外,驴血、驴骨、胎盘等加工副产物中也有很高的营养价值及应用价值^[2]。驴骨中蕴含大量宝贵的营养资源,如驴骨胶原及其肽类、硫酸软骨素等具有独特生物活性的物质^[3],可用于食品、化妆品生产中,具有很高的开发利用价值^[4]。但目前,驴骨大多以骨粉等粗加工形式被少量利用,其余大多数都被废弃并导致严重的环境污染。开发一种安全高效的从驴骨中制备活性驴骨肽的方法成了亟待解决的问题。

肽类化合物广泛存在于自然界中,是指一类通过肽键连接氨基酸而成的化合物,它是机体组织细胞的基本组成成分。肽类特别是一些低聚肽,不仅具有比蛋白质更好的消化吸收性能,而且还具有调节人体生理机能等作用。生物活性肽就是指一类介于氨基酸与蛋白质之间的分子聚合物^[5],具有增强机体防御功能、调节生命节律、预防疾病和促进康复等多种生物学功能^[6]。近年来,已经发现了一些具有改善骨质疏松活性的肽,如鱼骨胶原肽、龟鹿胶肽等,具有能够增加骨密度、促进成骨细胞增殖及相关酶分泌^[7-8]、改善骨质疏松的活性。

骨质疏松症是一种全身性的骨代谢疾病,具有骨量减

少、骨组织微结构退化、骨脆性增加等特征,常表现为患者骨密度下降、腰背疼痛、骨折等症状^[9]。骨质疏松症发病率逐年升高,目前全世界约有 2 亿人患骨质疏松症,骨质疏松症已被公认为是仅次于心血管疾病的第二大健康杀手,已成为极为严重的公共健康问题^[10]。

目前,国内关于从驴骨中制备具有抗骨质疏松活性的驴骨肽的研究鲜见报道,利用酶法开发具有生物活性的驴骨肽具有重要的理论意义和应用价值。笔者以驴骨粉为原料,酶法制备大于 3 kD 和小于 3 kD 这 2 种分子量的驴骨肽,并考察其对成骨细胞 MG-63 中碱性磷酸酶活性的影响,确定具有抗骨质疏松活性的不同分子量驴骨肽的制备方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 驴骨粉,东阿阿胶股份有限公司;胰蛋白酶(10 000 U/g),南宁庞博生物工程有限公司;成骨细胞 MG-63:武汉普诺赛生物科技有限公司;无水乙醇(分析纯)、氢氧化钠(分析纯)、三氯乙酸(分析纯)、三氟乙酸(分析纯)、硫化钠(分析纯)、乙腈(色谱纯),北京化学试剂公司;3-(4,5-二甲苯噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、牛血清蛋白、维生素 B₁₂、谷胱甘肽及胶原蛋白, Sigma 公司;Giemsa 液,索莱宝公司。

Agilent 1260 高效液相色谱仪、Agilent 1100 型氨基酸自动分析仪,美国安捷伦公司;MSM2013 实验室用膜分离设备,上海摩速科学器材有限公司;UV-2010PC 紫外可见分光光度计,尤尼克(上海)仪器有限公司;VersaMax Tunable Microplate Reader 光栅式恒温酶标仪, VersaMax Tunable 公司;

作者简介 刘楚怡(1986—),女,黑龙江大庆人,工程师,博士,从事功能食品研究。*通信作者,高级工程师,博士,从事食品、化妆品研发和功效研究。

收稿日期 2019-02-21

BX43 荧光显微镜, Olympus 公司。

1.2 酶解最适蛋白酶的筛选 选择木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶、风味蛋白酶、中性蛋白酶、胃蛋白酶、菠萝蛋白酶和胰蛋白酶等蛋白酶, 分别在最适工艺条件下进行驴骨粉酶解试验。酶解结束后, 95 °C 灭酶。茚三酮法分别测定每一反应水解度, 利用南京建成生物工程研究所的碱性磷酸酶试剂盒检测细胞中碱性磷酸酶 (AKP) 活力。以水解度大小和 AKP 活力为指标, 确定每种蛋白酶的酶解能力, 筛选最适蛋白酶。

1.3 驴骨粉酶解条件优化 通过单因素试验对驴骨粉酶解的 pH、温度、底物浓度和加酶量等条件进行优化。将驴骨粉加入蒸馏水配成不同浓度的驴骨粉溶液, 用 NaOH 溶液分别调节到指定 pH, 按照一定加酶量分别加入胰酶, 在指定温度水浴中酶解 3 h 后, 95 °C 灭酶, 茚三酮法分别测定每一反应水解度, 重复 3 次, 结果取平均值。经过酶的筛选, 温度、加酶量和 pH 的单因素条件筛选, 并在单因素研究的基础上, 确定响应面优化的条件。通过响应面分析最后获得酶解最优条件, 并对最优酶解条件下的酶解产物及胶原肽分别进行高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 检测。

1.4 成骨细胞 MG-63 的复苏培养及传代 达尔伯克 (氏) 必需基本培养基 (DMEM) 按照 100 单位/mL 加入青霉素、链霉素, 过滤除菌。0.25% 胰蛋白酶: 称取 0.25 g 胰蛋白酶溶于 100 mL PBS 中, 4 °C 过夜后使用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 分装后冷藏于 -20 °C。

细胞培养: 以 DMEM 完全培养基调整细胞密度为 2×10^5 个/mL 的细胞悬液, 接种于 6 孔板, 每孔体积 2 mL, 置于 37 °C、5% 的 CO₂ 培养箱内培养。贴壁 24 h 后弃培养液, 分别加入含各种驴骨胶原肽的完全培养液。每组设置 3 个复孔, 在 37 °C、5% 的饱和湿度培养箱中连续培养 5 d, 每 2 d 换液一次。

1.5 分子量分布的测定 使用 TSK GEL G2000SWXL 色谱柱, 通过高效液相色谱测定驴骨肽的分子量分布。检测条件为以体积比 1:1 的乙腈与 0.2% 三氟乙酸混合溶液为流动相, 按 0.5 mL/min 的流速过柱, 紫外检测波长为 225 nm。取牛血清蛋白、维生素 B₁₂、谷胱甘肽及胶原蛋白样品各 1 mg, 分别溶于 1 mL 的纯水中, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后进样。结果通过 GPC 软件进行分析。

1.6 驴骨肽基本组成的测定 对驴骨肽的基本理化性质进行检测, 包括蛋白质含量、糖原含量、脂肪含量、水分以及灰分。采用的具体方法如下: 蛋白含量的测定按照凯氏定氮法, 根据国标 GB/T 5009.5—2016 测定; 糖原含量的测定按照蒽酮比色法, 根据 GB/T 9695.31—2008 测定; 脂肪根据国标 GB/T 5009.6—2016 测定; 水分根据国标 GB 5009.3—2016 测定; 灰分根据国标 GB5009.4—2016 测定。

1.7 碱性磷酸酶 (AKP) 活性的测定 碱性磷酸酶分解磷酸苯二钠, 产生游离酚和磷酸, 酚在碱性溶液中与 4-氨基安替吡啉作用经铁氰化钾氧化生成红色醌衍生物, 根据红色深浅可以测定酶活性的高低。按照南京建成生物工程研究所的

碱性磷酸酶试剂盒说明书方法进行检测。

$$\text{AKP 活性增长率} = (\text{添加肽后细胞 AKP 活性} - \text{未加肽前细胞 AKP 活性}) / \text{未加肽前细胞 AKP 活性} \times 100\%$$

1.8 数据统计 采用 SPSS 软件和 Design expert 软件进行数据统计和方差分析。

2 结果与分析

2.1 酶解最适酶的筛选 使用 7 种蛋白酶在各自特定的最佳酶促水解条件下进行蛋白的酶促水解。由图 1 可知, 随着酶解时间的增加, 水解度逐渐增加, 但水解度的增加趋势逐渐减缓。当水解时间高于 120 min 时, 胰酶和风味蛋白酶酶解效果显著优于其他酶, 其中风味蛋白酶水解度最高。

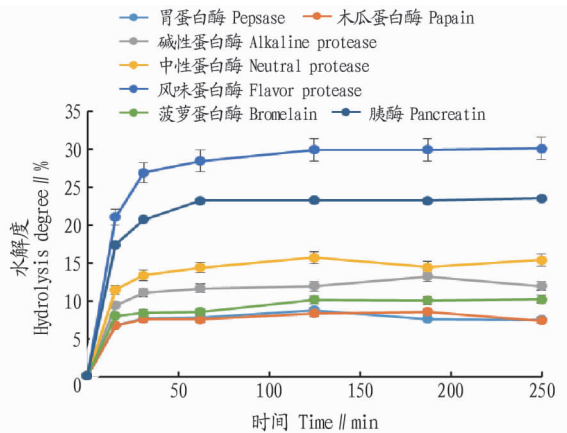


图 1 7 种蛋白酶酶解驴骨粉的水解度变化

Fig. 1 Changes in hydrolysis degree of 7 kinds of proteases for enzymatic hydrolysis of donkey bone powder

由图 2 可知, 7 种蛋白酶在各自特定的最佳酶促水解条件下水解 3 h 后, 除胃蛋白酶外, AKP 酶活力均显著高于未酶解的驴骨胶原。并且, AKP 酶活由高到低的顺序依次为胰酶水解物、风味蛋白酶水解物、中性蛋白酶水解物、碱性蛋白酶水解物、木瓜蛋白酶水解物、菠萝蛋白酶水解物、胃蛋白酶水解物, AKP 酶活最高的水解物为胰酶水解物。选用胰酶和风味蛋白酶进行单因素条件优化。

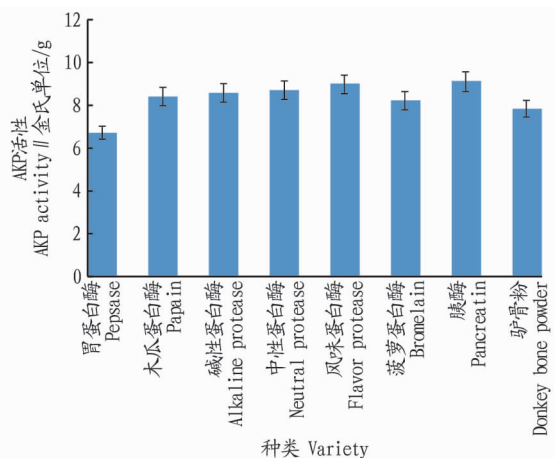


图 2 7 种蛋白酶的驴骨胶原水解物对成骨细胞 AKP 活性的影响
Fig. 2 Effects of 7 kinds of proteases hydrolysates from donkey bone glue on AKP activity in osteoblasts

2.2 酶解条件优化 通过单因素试验选择胰酶和风味蛋白酶酶解驴骨胶原的条件,分别考察 pH、底物浓度、温度和加

酶量对酶解程度的影响(图 3)。

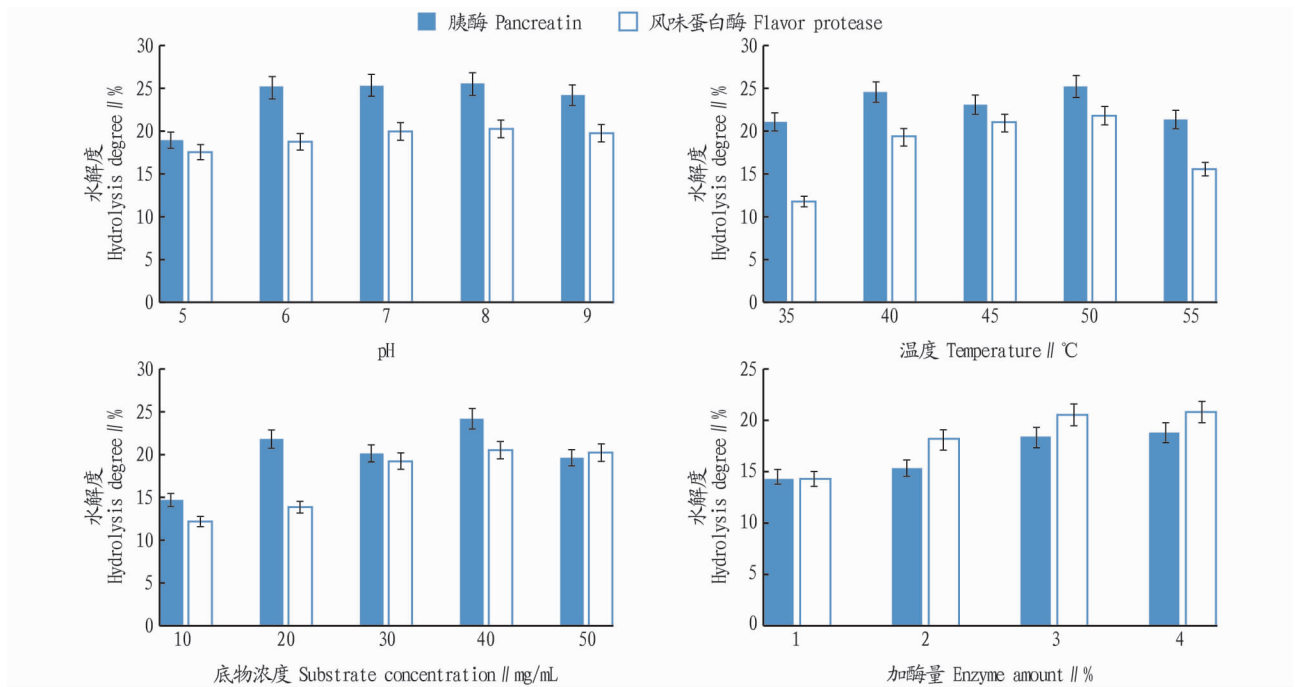


图 3 驴骨胶原酶解单因素试验结果

Fig. 3 Single factor test results of enzymatic hydrolysis of donkey bone collagen

通过以上单因素试验可以看出,在单因素的基础上,采用 Design-Expert8.0.5 中的 Box-Behnken 中心组合进行 3 因素 3 水平设计响应面试验,以 pH(A)、温度(B)和底物浓度(C)为变量,其中 pH 选择 7、8、9,底物浓度选择 20、30 和 40 mg/mL,温度选择 40、45、50 °C,中心点重复 5 次共 17 个处理得到如下设计方案及结果。17 个处理条件及结果如表 1 所示。

表 1 酶解中心组合试验设计及结果

Table 1 Center combination test design and results of enzymatic hydrolysis

序号 No.	A. 温度 Temperature °C	B. pH	C. 底物浓度 Substrate concentration mg/mL	水解度 Hydrolysis degree/%	AKP 增长率 AKP growth rate/%
1	45	9	40	17.80	4.76
2	50	8	40	19.35	7.58
3	45	8	30	22.11	9.14
4	40	8	20	24.44	6.48
5	45	9	30	17.05	7.02
6	50	7	40	20.80	6.33
7	40	8	20	19.73	8.38
8	45	8	40	22.20	7.97
9	50	9	20	22.50	5.22
10	50	9	30	13.97	6.01
11	40	7	30	21.30	8.15
12	45	7	30	21.60	9.09
13	45	8	30	22.38	9.12
14	45	7	20	21.57	8.09
15	45	8	30	22.55	9.08
16	45	8	30	24.35	7.59
17	45	8	30	24.47	7.97

方差分析结果表明,该数学模型 F 值为 4.10 ($P=0.0382 < 0.05$),达到了显著水平,说明该方程的试验点与结果相吻合,而失拟性检验 F 值为 1.55 ($P=0.3330 > 0.05$),差异不显著,表明方程没有失拟因素,回归方程的拟合较好,模型能够反映真实的情况。

采用 Design-Expert8.0.5 统计分析软件进行回归优化得到 AKP 增长率模型为:

$$\text{AKP 增长率}(\%) = 8.58 - 0.055A - 1.08B - 0.19C - 0.018AB - 0.57AC + 0.33BC + 0.24A^2 - 1.26B^2 - 1.22C^2$$

图 4 分别表示的是 pH-温度、pH-底物浓度、温度-底物浓度对驴骨胶原蛋白水解物 AKP 增长率的影响。从各因素的分析可知,3 个自变量(温度、pH、底物浓度)均对 AKP 增长率有不同程度的影响。3 个反应条件对 AKP 增长率的影响程度大小排序为提取 pH、底物浓度、温度。“Prob > F” < 0.05 说明是模型中的显著因素。分别对各因素相互作用对 AKP 增长率的影响进行试验,得出试验方案的最佳条件。以成骨样细胞 MG-63 中 AKP 的分泌量为考察指标,驴骨胶原蛋白酶解的最优条件为将胰酶按照 4 000 U/g 加酶量加入 25.4 mg/mL 底物中,调节 pH 至 7.62,在 48.03 °C 反应 240 min,水解度为 22.25%,AKP 增长率为 8.92%。采用优选出来的最佳条件进行试验验证,得到的实际平均水解度为 22.45%,AKP 增长率为 9.03%。实际试验与理论值相差较小,因此 Box-Behnken Design-响应面优化驴骨胶原酶解条件的优化试验可行,模型设计合理。

2.3 酶解时间对驴骨肽分子量及 AKP 增长率的影响 在

前述得到的最佳酶解条件下,酶解不同时间,得到不同的酶解物,分析各产物对成骨样细胞 MG-63 中 AKP 分泌量的影响及平均分子量。通过 HPLC 分析酶解产物,并通过 GPC 软件分析对应酶解产物的相对分子质量分布(表 2)。发现加

入 2 000 U/g 胰酶,酶解 10 min 的酶解产物,AKP 增长率为 9.84%,平均分子量为 3 315 Da;加入 2 000 U/g 胰酶,酶解 20~45 min,平均分子量为 1 000~3 000 Da,其中 AKP 增长率最高的为酶解 30 min 时,AKP 增长率为 9.19%。

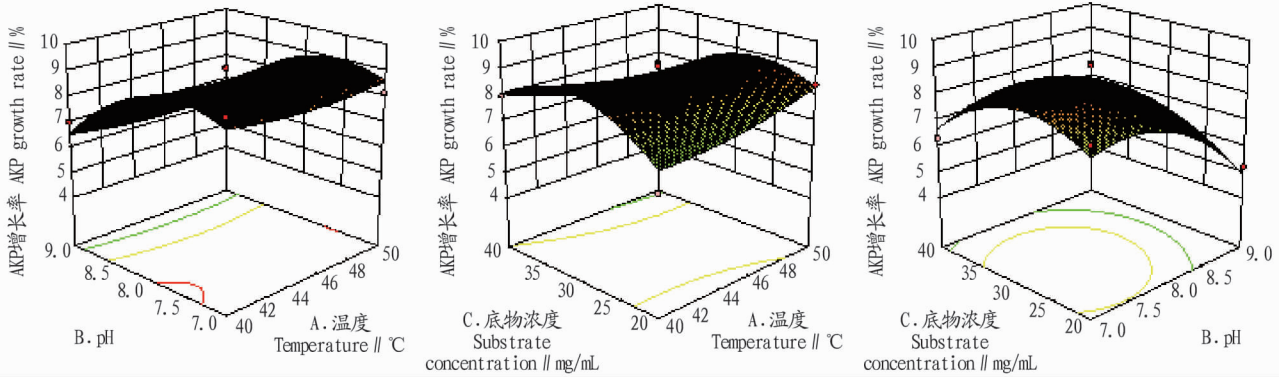


图 4 双因素交互作用对驴骨胶原酶解 AKP 增长率的响应面

Fig. 4 Response of two-factor interaction to the AKP growth rate in enzymatic hydrolysis of donkey bone collagen

表 2 酶解时间对平均分子量和 AKP 增长率的影响

Table 2 Effect of enzymatic hydrolysis time on average molecular weight and AKP growth rate

酶解时间 Enzymatic hydrolysis time//min	平均分子量 Average molecular weight//Da	AKP 增长率 AKP growth rate//%
0	4 652	7.84
10	3 315	9.84
20	2 780	9.31
30	1 963	9.19
45	1 176	8.02
60	861	9.66
90	797	9.83
120	725	9.38
180	695	7.95

2.4 驴骨肽基本组成分析 按照国标方法分别对按照以上工艺制备的 2 种驴骨肽及驴骨粉的基本组成进行分析,其基本组成如表 3 所示。经过以上工艺,驴骨肽中的蛋白含量从驴骨粉中的 57.3% 增加到了 87.6% 和 91.9%。在驴骨肽加工过程中,灰分也有了大幅降低,分别降低至 1.4% 和 1.1%。另外,脂肪含量从 10.5% 降低到了 6.2% 和 4.2%。在驴骨肽产品中,还存在部分未除去的脂肪及碳水化合物等物质,这是因为在以上工艺过程中为了防止引入其他化学物质增加其安全风险,并未进行脱脂步骤,这可以避免在驴骨肽制备过程中引入有害物质。

表 3 驴骨肽基本成分

Table 3 Basic components of donkey bone peptide

分类 Classification	水分 Moisture	蛋白 Protein	脂肪 Fat	灰分 Ash	碳水化合物 Carbohydrate
<3 kD 驴骨肽<3 kD donkey bone peptide	3.6	87.6	6.2	1.4	1.1
>3 kD 驴骨肽>3 kD donkey bone peptide	3.4	91.9	4.2	1.1	0.0
驴骨粉 Donkey bone powder	5.6	57.3	10.5	26.4	0.3

3 结论

该研究得到具有最佳抗骨质疏松活性的 2 种分子量的驴骨肽制备工艺,制备得到的大于 3 kD 驴骨肽粉平均分子量为 3 315 Da,蛋白含量为 91.9%,可使成骨细胞的碱性磷酸酶活性增加 9.84%;小于 3 kD 驴骨肽粉平均分子量为 797 Da,蛋白含量为 87.6%,可使成骨细胞的碱性磷酸酶活性增加 9.83%。

参考文献

- [1] 尤金花,田守生,郭尚伟,等.阿胶及其疗效功能的研究进展[J].明胶科学与技术,2009,29(4):169-174.
- [2] 吴宏忠,杨帆,崔书亚,等.阿胶有效组分对辐射损伤小鼠造血系统的保护作用研究[J].中国临床药理学与治疗学,2007,12(4):417-421.
- [3] 李志,陈壁锋,黄俊明,等.阿胶口服液对小鼠细胞免疫和体液免疫功能的影响[J].中国卫生检验杂志,2008,18(7):1426-1427,1437.

- [4] 杨迎伍,张利,李正国.畜骨的营养价值、开发现状及发展前景[J].食品科技,2002(1):60-61.
- [5] WANG S Y,ZHAO J,CHEN L,et al. Preparation, isolation and hypothermia protection activity of antifreeze peptides from shark skin collagen[J]. LWT-Food Science and Technology,2014,55(1):210-217.
- [6] CHI C F,HU F Y,WANG B,et al. Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle [J]. Journal of functional foods,2015,15:301-313.
- [7] 常德有,杨靖,董福慧.阿胶对体外培养大鼠成骨细胞增殖、分化功能的影响[J].中国老年学杂志,2009,29(24):3230-3232.
- [8] 杨浩侠,杨洋,薛鹏,等.龟鹿胶、淫羊藿及红景天对骨质疏松大鼠骨密度及破骨细胞的影响[J].中国组织工程研究,2013,17(15):2669-2676.
- [9] 邢燕,毕宏淼,尹丽梅,等.中医药治疗骨质疏松症的进展[J].中国骨质疏松杂志,2011,17(12):1115-1118.
- [10] 马俊岭,郭海英,阳晓东.骨质疏松症的流行病学概况[J].中国全科医学,2009(18):1744-1746.