

Camembert 干酪制备酪蛋白磷酸肽的初步研究

王青华^{1,2}, 刘雅楠¹, 郑志强¹, 赵征¹

(1. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457) (2. 河北工程大学食品科学技术系, 河北 邯郸 056001)

摘要: 本文以 Camembert 干酪流程制备的干酪为原料, 分离并测定了酪蛋白磷酸肽粗制品。测得干酪中酪蛋白磷酸肽的质量分数为 7.80%, 利用大孔强碱性阴离子交换树脂对粗制品进行纯化, 并对其阻钙沉淀活性分别进行了测定, Camembert 干酪中提取的酪蛋白磷酸肽 (CPPs) 比商品 CPPs 具有更好的阻钙沉淀活性。

关键词: Camembert 干酪; 酪蛋白磷酸肽; 纯化; 阻钙沉淀活性

中图分类号: TS252.53; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)05-0466-03

Preliminary study on the Preparation of Casein Phosphopeptides from Camembert Cheese

WANG Qing-hua^{1,2}, LIU Ya-nan¹, ZHENG Zhi-qiang¹, ZHAO Zheng¹

(1. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)(2. Department of Food Science and Technology, Hebei University of Engineering, Handan 056001, China)

Abstract: Crude Casein Phosphopeptides (CPPs) were isolated from Camembert cheese and purified by D-201 anion-exchange resin. The CPPs extracted from Cheese showed higher activity to prevent calcium precipitate than that of the commercial CPPs.

Key words: camembert cheese; casein phosphopeptides(CPPs); purification; activity to prevent calcium precipitate

酪蛋白磷酸肽 (Casein Phosphopeptides, 简称 CPPs)。由于它在小肠中性和弱碱性环境中能确保钙的溶解状态并促进肠道吸收, 所以又被称为促钙吸收因子^[1-2]。CPP 是目前可促进钙吸收的化合物中唯一的多肽物质, 所以倍受学术界和产业界的关注。在日本和德国已被列入重点推荐的功能性食品添加剂。我国现在已经有 CPPs 产品投放市场, 作为食品添加剂广泛用于婴幼儿奶粉、钙铁锌等矿物质补充食品及营养保健食品中^[3-4]。

传统的工业生产 CPPs 一般以酪蛋白或牛奶为原料, 用蛋白酶水解而得到的。近年来发展起一种制备 CPPs 的方法是微生物发酵法, 即直接利用微生物发酵过程中生产的蛋白酶(复合)降解蛋白质, 可达到较高的水解度, 从而相对地降低酶法生产活性肽的成本。

干酪是一种营养价值非常高的发酵乳制品, 但在我国由于经济技术等原因, 干酪的生产和消费还处于刚刚起步的状态。乳源生物活性肽-酪蛋白磷酸肽的研究是近年来研究热点之一, 但关于干酪中的生物活性

肽研究的还很少, 本文对干酪中的酪蛋白磷酸肽进行了初步研究。

本文所选的 Camembert 干酪为自制的一种霉菌成熟软质干酪。Camembert 干酪成熟期间, 特有的卡门培尔干酪青霉 (*penicillium camembert*) 和白青霉 (*penicillium candidum*) 在其表面生长, 由它们产生的蛋白酶和脂肪酶从干酪表面向中心渗透, 促使干酪成熟。并且会促使乳蛋白降解产生生物活性肽, 包括 CPPs, 从而对促进 Camembert 干酪的消费和利用具有一定的意义。

1 原料与方法

1.1 实验材料

Camembert 干酪 (实验室自制); 原料乳为新鲜无抗牛乳 (相对密度为 1.030, 脂肪为 3.1%, 蛋白质为 2.9%); 发酵剂为嗜温性发酵剂 (科汉森公司); 凝乳酶为干粉末状复合凝乳酶 (科汉森公司); 卡门培尔干酪霉菌发酵剂 (科汉森公司); D-201 大孔强碱性阴离子交换树脂 (南开大学化工厂), 商品 CPPs (杭州康源食品科技有限公司)。

1.2 仪器

干酪槽; 干酪切割刀 (实验室自制); 恒温恒湿

收稿日期: 2008-01-08

作者简介: 王青华 (1978-) 女, 硕士研究生, 主要从事功能性乳制品的研究

通讯作者: 赵征

库 (KBHW-4); 干酪模具; 水浴锅; pH 计; 冷冻离心机; 北京四环科学仪器厂; LGJ25 冷冻干燥机; 北京四环科学仪器厂; 电热鼓风干燥箱 (天津大宇机电有限公司); 层析柱 (50 cm×2.6 cm); DHL-A 电脑恒流泵 (上海精科实业有限公司); HD-A 电脑采集器 (海沪西分析仪器厂); HD-3 紫外检测器 (上海沪西分析仪器厂); DBS-100 电脑全自动部分收集器 (上海沪西分析仪器厂有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 干酪加工工艺流程及最佳工艺条件

1.3.1.1 成品 A 制作

1.3.1.1.1 工艺流程

原料乳→标准化→巴氏杀菌→冷却→添加发酵剂→保温→调整酸度→添加 CaCl₂→添加霉菌培养物→添加凝乳酶→静置凝乳→凝乳切割→搅拌→入模→翻转→冷却过夜→盐渍→成熟→成品 A (无瑞士乳杆菌) 于恒温恒湿库中贮存, 贮存期为 60 d, 随着时间的再延长, 成品组织结构有流体化的趋势。

1.3.1.1.2 工艺条件

发酵剂添加量为 0.01%, CaCl₂ 添加量为 0.02%, 凝块切割边长 15 mm, 装模 pH 值为 5.4, 加盐量为 1.5%, 霉菌添加量为 0.005%^[5]。

1.3.1.2 成品 B 制作

按以上工艺流程, 在工艺条件中再添加 0.005% 的瑞士乳杆菌, 制得成品 B (含瑞士乳杆菌) 保存期为 45 d^[6-11]。

1.3.2 Camembert 干酪中 CPPs 粗制品的分离

利用钙-乙醇沉淀法, 方法如下:

干酪 + 蒸馏水 → 研磨 → 离心 (4000 r/min) 20 min → 上清液 → 调节 pH 至 4.6 → 离心 (4000 r/min) 20 min → 上清液 → 加 1% CaCl₂, 等体积的无水乙醇 → 静置 4 h → 离心 (4000 r/min) 20 min → 沉淀 → 冷冻干燥 → CPPs

CPPs 粗制品含量/% = CPPs 质量 / 干酪的干重 × 100%

1.3.3 酪蛋白磷酸肽 (CPPs) 粗制品的纯化

采用 D-201 型大孔强碱性阴离子交换树脂纯化酪蛋白磷酸肽 (CPPs) 粗制品。

1.3.4 CPPs 阻止磷酸钙沉淀效果的检测

在烧杯中加入适量 0.1 mol/L NaH₂PO₄ 和 CPPs, 使两者在 500 mL 反应体系中终浓度分别为 0.008 mol/L 和 0.01 g/L、0.05 g/L、0.1 g/L、0.2 g/L, 保温至 37 °C 后加入 CaCl₂, 使之终浓度达 0.008 mol/L 时, 立即用 0.05 mol/L 的 NaOH 将反应体系 pH 调至 7.2 并不断滴加 0.05 mol/L 的 NaOH 使 pH 保持在 7.2, 从调节 pH 值即开始计时, pH 值调至 7.2 约需 2 min, 从 2

min 开始连续记录 0.05 mol/L NaOH 的消耗量, 观察出现沉淀的时间, 共持续 60 min。

2 结果与讨论

2.1 CPPs 粗制品的含量

成熟期不同的 CPPs 的含量测定结果如表 1。

表 1 成熟期不同的干酪 (干重) 中 CPPs 的质量分数/%

Table 1 The content of CPPs of cheese during different period

成熟时间/d	1	15	30	45	60
成品 A	0	1.14	2.68	5.45	7.37
成品 B	0	1.58	4.56	7.80	

由表 1 可看出, 干酪成品 A 和成品 B 中 CPPs 的含量随着成熟时间的延长而增加, 未成熟的干酪中不含或含有很少的 CPPs, 可以忽略不计, 随着成熟时间的延长, 由于干酪中酪蛋白的不断水解, CPPs 的产生量逐渐上升, 成熟期 60 d 时, 成品 A 中 CPPs 的含量较高, 高达 7.37%。成品 B 中成熟期为 45 d 时, CPPs 的含量较高, 高达 7.80%。同一成熟期内, 成品 B 中 CPPs 的含量比成品 A 中 CPPs 的含量要高。可见, 添加瑞士乳杆菌后, 产生的 CPPs 的量较高, 说明瑞士乳杆菌具有更强的水解力; 干酪中酪蛋白的水解程度与 CPPs 的产生量是呈正比的 (在干酪的保质期内)。

2.2 离子交换树脂纯化 CPPs

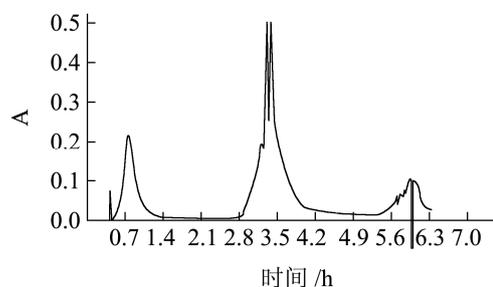


图 1 CPPs 的洗脱图谱

Fig.1 The curve of the purified CPPs from the fermented milk

注: 洗脱条件为洗脱柱为 D-201 阴离子交换树脂柱 (50 cm×2.6 cm), 洗脱液 0.1 mol/L HCl, 流速 3 mL/min, 上样体积为 60 mL, 上样质量浓度 20 g/L, 检测波长为 280 nm。

由图 1 可看出, 洗脱曲线中出现 3 个明显的吸收峰, 经检测, 第一个峰不含磷, 这部分是由去离子水洗脱得到的, 第二和第三个峰均含有磷, 是由 0.1 mol/L HCl 洗脱得到的目标峰, 收集出现这两个峰的管数, 经冷冻干燥机冷冻干燥, 收集纯化后的 CPPs。

2.3 纯化 CPPs 的阻钙沉淀作用

CPPs 体外阻钙沉淀作用测定结果如表 2 所示。从表 2 可以看出, CPPs 为 0.5 g/L 时能够完全阻止磷酸钙沉淀的生成; CPPs 为 0.2 g/L 时自制的 CPPs 和商品

CPPs 分别在 50 min 和 40min 时出现混浊; CPPs 为 0.04 g/L 和 0.06 g/L 时只能使磷酸钙沉淀的生成推迟 10 min。通过比较得出自制的 CPPs 的持钙能力稍强于商品 CPPs。这可能因为自制的 CPPs 的纯度高于商品 CPPs。

表 2 不同质量浓度的 CPPs 的持钙能力测定

Table 2 The result of the activity to prevent calcium precipitation of CPPs with different content

样品	CPPs/ (g/L)	时间/min					
		10	20	30	40	50	60
对照	0	++	++	++	++	++	++
	0.04	-	+	++	++	++	++
	0.06	-	+	++	++	++	++
	0.1	-	-	+	+	++	++
	0.2	-	-	-	-	-	+
自制 CPPs	0.5	-	-	-	-	-	-
	0.04	-	+	++	++	++	++
	0.06	-	+	++	++	++	++
	0.1	-	-	+	++	++	++
	0.2	-	-	-	-	+	+
商品 CPPs	0.5	-	-	-	-	-	-

注:“-”澄清;“+”混浊;“++”沉淀

3 结论

Camembert 干酪在成熟过程中随着酪蛋白的水解产生了一定量的 CPPs, 其含量随着成熟时间的延长而增加。干酪中的 CPPs 与工业用酶水解法制得的 CPPs 相比, 具有较好的阻钙沉淀作用。干酪中的 CPPs 的分离纯化以及干酪中 CPPs 的结构有待于进一步深入研究。

(上接第 475 页)

较高使豆腐的成本升高, 但色泽洁白; 大豆:花生为 5:1 时豆味掩盖了花生味及花生豆腐特有的香味, 失去了花生应用于豆腐制作中的意义; 因此综合考虑认为大豆:花生等于 4:1 为最佳配比。

3 结论

(1) 将花生应用到豆腐制作中, 对豆腐的结构、色泽都不会造成较大的不利影响, 而且还能提高豆腐的口感, 消除豆腥味, 在市场开发上有很好的前景。

(2) 此花生豆腐的最佳工艺为: 将花生在 2450 MHz 下 450 kW 烘烤 5 min, 以 1:4 (m/m) 加入大豆

参考文献

- [1] 冯凤琴,王博诚,许时婴,等.酪蛋白磷酸肽对切除卵巢后老龄雌性大鼠骨密度的影响[J].营养学报,2003,25 (1):98-100
- [2] 陈亚非. 陈金星,朱韶娟,徐文霞,酪蛋白磷酸肽促进人体钙吸收的作用研究[J].食品科学,2002,23 (4):130-132
- [3] 冯凤琴,许时婴,王璋,生理活性物质酪蛋白磷酸肽的功能及应用[J].食品与发酵工业,1996,5:73-76
- [4] 庞广昌,陈庆森.生物活性肽—酪蛋白磷酸肽(CPPs)的研究,应用及展望[J].食品科学,1999,20 (6):25-29
- [5] Reynolds EC. Remineralisation of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide calcium phosphate solutions[J]. J. Dent. Res., 1997, 76 (9): 1587-1596.
- [6] 郑志强,等.霉菌成熟软质干酪工艺参数优化的研究[J].中国乳品工业,2007,35 (6) :17-20.
- [7] Nagai T.et al.Effect of casein phosphopeptides on fertilization in vitro of bovine oocytes matured in culture[J].Animal Science and Technology.1996,67(12):1037- 1042
- [8] Kawahara.et al. Characterization of casein phosphopeptides from fermented milk products [J]. Journal of Food Science, 2005, 60:522-536
- [9] Roudout Algon F, Le Bars D, KerhoasL, et al. Phosphopeptides from Comet cheese: nature and origin [J]. Journal of Food Science, 1994, 59:544-547.
- [10] Pellegrino L, Battelli G. Resimini P, et al. Alkaline phosphatase inactivation during Grana Padano cheese-making and related effects on cheese characterization and ripening [J]. Lait, 1997, 77: 217-220.
- [11] 乔文,齐崑,何志敏.离子交换树脂纯化酪蛋白磷酸肽研究[J].离子交换与吸附,2004,20(2): 144 -151

后加入 5 倍水磨浆得花生豆乳, 然后加入占大豆和花生总质量 0.25%的 GDL 和 2%的淀粉来成型花生豆腐。此工艺下制得的花生豆腐具有花生味浓、口感好、无涩味、豆味香和营养丰富的优势。

参考文献

- [1] 齐凤元,马勇,邵悦.大豆花生豆腐的研究[J].粮油食品,2006(2):44-45
- [2] 张志健.新型豆制品加工工艺与配方[M].北京:科学技术文献出版社,2002: 249-262