

酪蛋白磷酸肽持钙能力的研究

徐曼^{1,2}, 何东平², 卫娜¹, 童愈元²

(1. 广州泰邦食品添加剂有限公司, 广东广州 510655)

(2. 武汉工业学院食品科学与工程学院, 湖北武汉 430023)

摘要: 通过体外模拟实验考察酪蛋白磷酸肽(CPP)阻止磷酸钙沉淀的能力, 分析了水解度、CPP添加量、CPP的不同等级以及食品加工过程中的其他因素对CPP持钙能力的影响, 为CPP功能特性的评价以及在食品中的应用提供了依据。

关键词: 酪蛋白磷酸肽; 体外模拟; 持钙能力

文章编号: 1673-9078(2012)3-278-281

The Calcium Holding Capacity of Casein Phosphopeptide

XU Man^{1,2}, HE Dong-ping², WEI Na¹, TONG Yu-yuan²

(1. Taibang Food Additive Co., Ltd., Guangzhou 510655, China)

(2. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: The blocking calcium phosphate precipitation ability of casein phosphopeptide (CPP) was studied by *in vitro* simulation. The degree of hydrolysis, adding volume of CPP, the different levels of CPP and other factors of food processing influence to the calcium holding capacity of CPP were analyzed. The research results provided references for evaluation and food application of CPP.

Key words: casein phosphopeptide; *in vitro* simulation; calcium holding capacity

酪蛋白磷酸肽(Casein Phosphopeptide, CPP)是以牛乳酪蛋白为原料, 经过酶水解、分离纯化得到的一种生物活性肽, 其特殊的簇磷酸丝氨酸结构具有螯合钙的能力^[1]。

由于钙只有在小肠内呈可溶性的离子状态才能被吸收, 小肠上段的pH值较低, 钙可以离子状态存在, 而小肠下段呈中性至碱性, 钙离子容易与磷酸根离子结合产生磷酸钙沉淀, 导致人体对钙的吸收率大大下降^[2]。而CPP在动物小肠内pH呈中性到弱碱性的环境中, 能与钙螯合成可溶性的钙盐, 阻止磷酸钙沉淀的产生, 使肠内可溶性钙的含量保持在较高水平, 促进人体对钙的吸收利用^[3-5]。

本文通过体外模拟实验考察CPP阻止磷酸钙沉淀的能力, 分析了影响CPP持钙能力的因素, 为CPP功能特性的评价以及在食品中的应用提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酪蛋白(食品级), 广西庞博生物科技有限公司; 碱性蛋白酶2709(酶活20万U/g), 广西庞博生物科技有限公司; 其他试剂如盐酸、氢氧化钠、无水氯化钙、乙醇、淀粉、葡萄糖、苯甲酸钠、柠檬酸等均为

收稿日期: 2011-11-30

作者简介: 徐曼(1986-), 硕士, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程

国产分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

85-2 恒温磁力搅拌器, 常州国华电器有限公司; HH-S 恒温水浴锅, 上海索谱仪器有限公司; PHS-25 酸度计, 上海精密科学仪器有限公司; TDL-5A 台式低速离心机, 上海菲恰尔分析仪器有限公司; VFD-2000 冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; yp-1002N 电子天平, 上海菁海仪器有限公司; AUY120 分析天平, 岛津国际贸易(上海)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 不同等级的CPP的制备

1.3.1.1 CPP1的制备

称取一定量的酪蛋白按底物浓度5%加入到一定量的水中, 用1 mol/L NaOH调节其pH值为9.0, 保温至50℃, 搅拌使酪蛋白全部溶解。加入9000 U/g的碱性蛋白酶, 并不断滴加1 mol/L NaOH维持水解液pH为9.0。酶水解3 h后, 停止酶解。将酶解液置于90℃水浴中30 min, 使酶失活。3000 r/min离心10 min, 去下层沉淀, 取上清液冷冻干燥, 即为酪蛋白肽(CPP1)。

1.3.1.2 CPP2的制备

称取一定量的CPP1, 按底物浓度10%溶于一定量的水中, 用1 mol/L HCl调节溶液pH值为5.5, 加入1.0% (w/v) 无水氯化钙, 再加入无水乙醇使水解

液中乙醇浓度达到 50%，静置 2 h，取下层沉淀冷冻干燥即为粗制酪蛋白磷酸肽（CPP2）。

1.3.1.3 CPP3 的制备

称取一定量的 CPP2，按底物浓度 5% 溶于一定量的水中，用恒流泵控制流速 6 m/h，以洗脱温度 25 °C 依次通过 001×7 强酸性阳离子交换柱、717 强碱性阴离子交换柱，收集洗脱液，冷冻干燥即为精制酪蛋白磷酸肽（CPP3）。

1.3.2 水解度（DH）的测定

采用 pH-Stat 法^[6]。

1.3.3 CPP 持钙能力的体外模拟实验原理

由于钙离子进入人体后易于人体内的磷酸根离子结合生成磷酸钙沉淀，不能被人体吸收，而 CPP 具有螯合钙离子、阻止生成磷酸钙沉淀的作用。在与人体温度 37 °C、小肠末端 pH8.0 条件相同的反应体系中引入磷酸根离子和 CPP，然后加入钙离子，观察 CPP 阻止磷酸钙沉淀的效果。

在溶液中有 CaCl₂ 和 NaH₂PO₄ 存在的情况下，会生成 Ca₃(PO₄)₂ 沉淀。其反应过程如下^[7]：



由于以上两步反应都释放出 H⁺，可采用 pH-Stat 法检测 CPP 对以上反应的影响，即加入 NaOH 溶液，使反应体系的 pH 维持在一固定值，当加入 NaOH 溶液的速度较慢且量较小时，即为产生磷酸钙沉淀的速度较慢量较小，因此可认为反应体系中 CPP 阻止磷酸钙沉淀形成的效果较好。具体操作如下：

在 100 mL 的反应体系中加入 NaH₂PO₄ 和 CPP，使二者在反应体系中的浓度分别为 0.008 mol/L 和 0.1 g/L。将溶液加热至 37 °C 保温，然后加入 CaCl₂，使反应体系中 CaCl₂ 的浓度为 0.008 mol/L。立即加入 0.05 mol/L 的 NaOH 溶液，在 2 min 内将反应体系的 pH 值调节至 8.0，随后不断加入 0.05 mol/L NaOH，使反应体系的 pH 维持在 8.0。从第 2 min 开始，每隔 5 min 记录一次 0.05 mol/L NaOH 的消耗量，持续 1 h^[7]。

2 结果与讨论

2.1 水解度对 CPP 持钙能力的影响

向反应体系中分别加入水解度为 12%、14%、16%、18%、20%、22% 的 CPP，按 1.3.3 中所述方法操作，以不加 CPP 的空白试验作对照。

由图 1 可以看出，未添加 CPP 时，磷酸钙沉淀在 5 min 内迅速形成。添加 CPP 后，磷酸钙沉淀形成速度明显减慢。随着 DH 的增加，CPP 的持钙能力随之

增强。DH 为 12~14% 的 CPP，可使磷酸钙沉淀的形成推迟 5~10 min，DH 为 16~18% 的 CPP，可推迟沉淀形成时间 10~15 min，DH 为 20~22% 的 CPP，可推迟沉淀形成时间 20 min 以上。

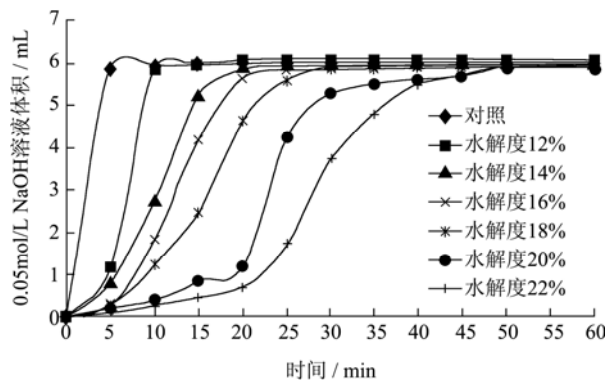


图 1 DH 与 CPP 持钙能力的关系

Fig.1 The relationship between the degree of hydrolysis and the ability to maintain calcium of CPP

2.2 不同 CPP 添加量的持钙能力比较

向反应体系中分别加入 0.06 g/L、0.08 g/L、0.1 g/L、0.2 g/L、0.5 g/L 的 CPP，按 1.3.3 中所述方法操作，以不加 CPP 的空白试验作对照。

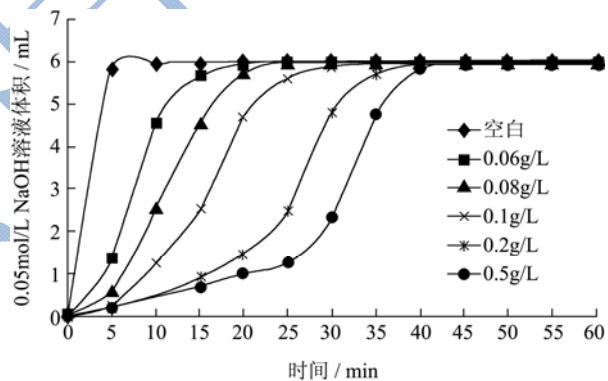


图 2 CPP 添加量与持钙能力的关系

Fig.2 The relationship between the add content of CPP and the ability to maintain calcium

由图 2 可以看出，CPP 的持钙能力随着添加量的增加而增强。CPP 添加量为 0.06~0.08 g/L 时，可使磷酸钙沉淀的形成推迟 5~10 min，添加量为 0.1 g/L 时，可使磷酸钙沉淀的形成推迟 10~15 min，添加量为 0.2 g/L 时，可使沉淀形成时间推迟 20~25 min，添加量为 0.5 g/L 时，可使沉淀的形成时间推迟 30 min 以上。

2.3 不同等级的 CPP 持钙能力的比较

向反应体系中分别加入浓度为 0.1 g/L 的 CPP1、CPP2、CPP3，按 1.3.3 中所述方法操作，以不加 CPP 的空白试验作对照。

由图 3 可以看出，随着 CPP 纯度的提高，持钙能力也随之增强。酪蛋白肽（CPP1）可使磷酸钙沉淀的形成推迟 5~10 min，粗制 CPP（CPP2）可使沉淀的形

成推迟 10~15 min, 精制 CPP (CPP3) 可使沉淀的形成推迟 25~30 min.

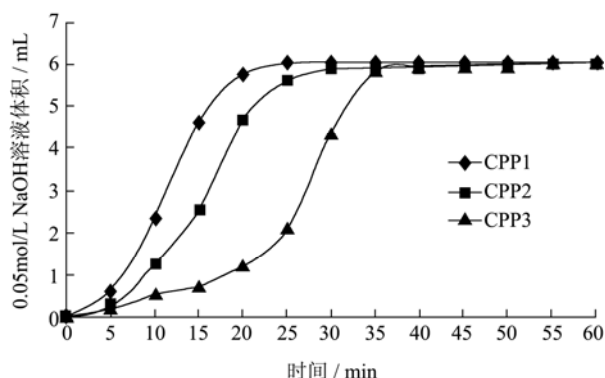


图3 CPP 的等级与持钙能力的关系

Fig.3 The relationship between the level of CPP and the ability to maintain calcium

2.4 食品加工过程中的其他因素对 CPP 持钙能力的影响

2.4.1 高温加工对 CPP 持钙能力的影响

将 CPP 在 100 °C 条件下加热 30 min, 然后按 1.3.3 中所述方法操作, 以未加热的 CPP 作对照。

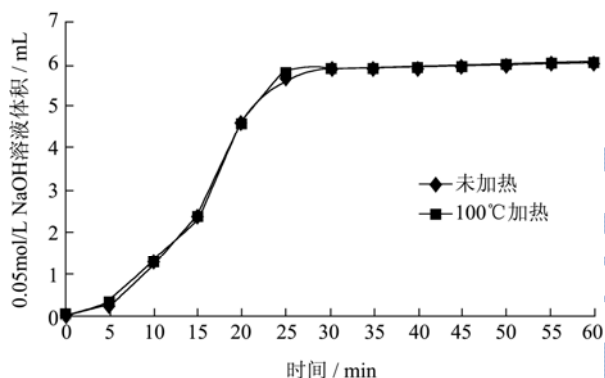


图4 高温加工与 CPP 持钙能力的关系

Fig.4 The relationship between the high-temperature processing and the ability to maintain calcium of CPP

由图4可以看出, 经 100 °C 加热 30 min 后的 CPP, 持钙能力并未发生明显变化。由此可见, 食品加工过程中的短时高温加热不会对 CPP 的持钙能力造成太大影响。

2.4.2 葡萄糖对 CPP 持钙能力的影响

分别向反应体系中添加 20 g/L、40 g/L、60 g/L、80 g/L、100 g/L 的葡萄糖, 然后按 1.3.3 中所述方法操作, 以未加葡萄糖的反应体系作对照。

由图5可以看出, 添加葡萄糖有加速磷酸钙沉淀的作用。葡萄糖浓度与加速沉淀的关系总体趋势表现为先减小后增大, 葡萄糖浓度在 20 g/L 和 100 g/L 时加速磷酸钙沉淀的效果最明显, 葡萄糖浓度为 60 g/L 时加速磷酸钙沉淀的效果最不明显。因此, 在食品加工中, 要注意葡萄糖对 CPP 持钙能力的影响。

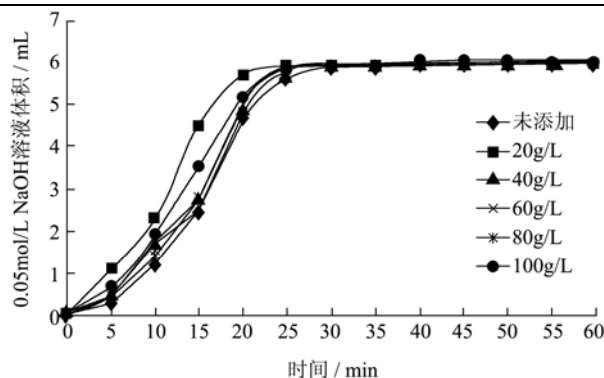


图5 葡萄糖与 CPP 持钙能力的关系

Fig.5 The relationship between the glucose and the ability to maintain calcium of CPP

2.4.3 淀粉对 CPP 持钙能力的影响

分别向反应体系中添加 20 g/L、40 g/L、60 g/L、80 g/L、100 g/L 的淀粉, 然后按 1.3.3 中所述方法操作, 以未加淀粉的反应体系作对照。

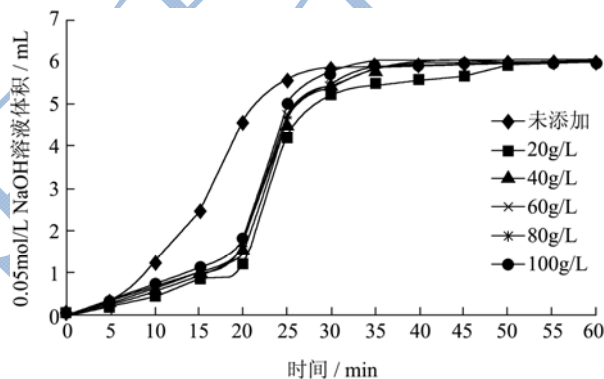


图6 淀粉与 CPP 持钙能力的关系

Fig.6 The relationship between the starch and the ability to maintain calcium of CPP

由图6可以看出, 与不加淀粉相比, 加入淀粉后可使磷酸钙沉淀形成的时间推迟 5~10 min, 不加淀粉时, 磷酸钙沉淀的形成时间为 10~15 min, 加入淀粉后, 沉淀的形成时间为 20~25 min。淀粉浓度与 CPP 持钙能力的大致关系为: 淀粉浓度越低, CPP 的持钙能力越好。

2.4.4 苯甲酸钠对 CPP 持钙能力的影响

苯甲酸钠是常用的防腐剂之一, 在食品中的应用十分广泛。分别向反应体系中添加 0.2 g/kg、0.4 g/kg、0.6 g/kg、0.8 g/kg、1.0 g/kg 的苯甲酸钠, 然后按 1.3.3 中所述方法操作, 以未加苯甲酸钠的反应体系作对照。

由图7可以看出, 与不添加苯甲酸钠相比, 添加苯甲酸钠可使磷酸钙沉淀时间推迟 10 min 左右。不加苯甲酸钠时, 磷酸钙沉淀的形成时间为 10~15 min, 加入苯甲酸钠后, 沉淀的形成时间为 25~30 min。苯甲酸钠浓度为 0.6 g/kg 时, 推迟沉淀形成的时间最长, 苯甲酸钠浓度为 1.0 g/kg 时, 推迟沉淀形成的时间最

短。

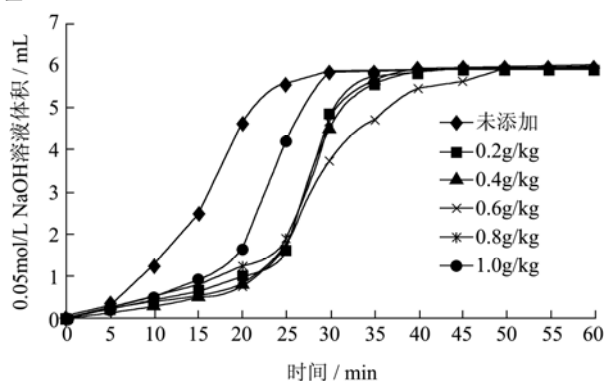


图7 苯甲酸钠与 CPP 持钙能力的关系

Fig.7 The relationship between the sodium benzoate and the ability to maintain calcium of CPP

2.4.5 柠檬酸对 CPP 持钙能力的影响

分别向反应体系中添加 2 g/L、4 g/L、6 g/L、8 g/L、10 g/L 的柠檬酸,然后按 1.3.3 中所述方法操作,以未加柠檬酸的反应体系作对照。

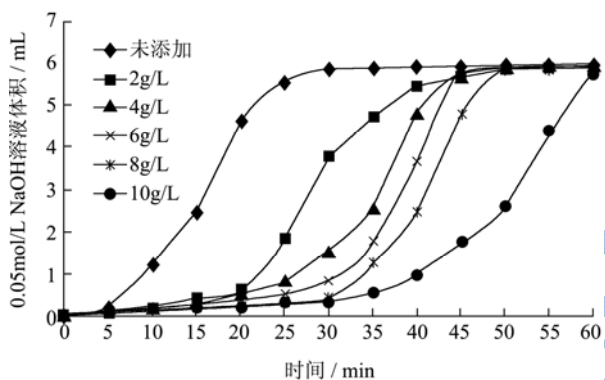


图8 柠檬酸与 CPP 持钙能力的关系

Fig.8 The relationship between the citric acid and the ability to maintain calcium of CPP

由图 8 可以看出,添加柠檬酸后,与不添加相比,磷酸钙沉淀的时间大大推迟。且柠檬酸添加量越大,阻止磷酸钙沉淀的效果越好。不加柠檬酸时,磷酸钙沉淀的形成时间为 10~15 min,添加 2 g/L、4 g/L、6~8 g/L、10 g/L 的柠檬酸时,沉淀形成时间分别为 25~30 min、30~35 min、35~40 min 和 45~50 min。这是因为柠檬酸也有螯合钙离子的能力^[8],所以和 CPP 一同使用时,可使阻钙沉淀的效果增强。

3 结论

3.1 对 CPP 的持钙能力进行了分析,考察了水解度、CPP 添加量、CPP 的不同等级对 CPP 持钙能力的影响,得出结论如下: CPP 的持钙能力随水解度的上升而增强;同时也随 CPP 添加量的增加和 CPP 纯度的提高而增强,精制 CPP (CPP3) 可是磷酸钙沉淀的形成推迟 25~30 min。

3.2 食品加工过程中的短时高温加热未对 CPP 的持钙能力造成太大影响;葡萄糖有加速磷酸钙沉淀的作用,葡萄糖浓度与加速沉淀的关系总体趋势为先减小后增大;添加淀粉可使磷酸钙沉淀形成的时间推迟 5~10 min;添加苯甲酸钠可使磷酸钙沉淀时间推迟 10 min 左右;添加柠檬酸可使磷酸钙沉淀的时间大大推迟。

参考文献

- [1] 高银,宋振南,方文兵.酪蛋白磷酸肽(CPP)的研究进展[J].安徽农学通报,2007,13(16):47-48
- [2] 段涛.酪蛋白磷酸肽功能研究进展[J].山东食品发酵,2008,4:43-45
- [3] Reynolds E C. et al. A selective precipitation purification procedure for multiple phosphoserylcontaining peptides and methods for their identification. Anal Biochem. 1994, 197: 197-202
- [4] 焦宇知,王彰.CPP(酪蛋白磷酸肽)新生产工艺研究[J].现代食品科技,2005,21(2):15-17
- [5] 王青华,刘雅楠,郑志强,等.Camembert 干酪制备酪蛋白磷酸肽的初步研究[J].现代食品科技,2008,24(5):466-468
- [6] Jens Adler-Nissen. Enzyme hydrolysis of food protein[M]. ELSEVIER APPLIED SCIENCE PUBLISHERS LONDON AND NEW YORK, 1986
- [7] 胡志和,庞广昌,闫亚丽,等.CPPs 阻钙沉淀活性与酪蛋白水解度之间关系的研究[J].食品科学,2001,22(1):18-22
- [8] 谢冠华.酶水解法制备水牛乳酪蛋白磷酸肽[D].南昌:南昌大学,2007