

酪蛋白磷酸肽活性单体分离纯化、固相合成及结构差异研究

刘果^{1,2}, 孙圣伟^{1,2}, 苗建银^{1,2}, 罗珍³, 夏祖猛³, 刘飞⁴, 郭宝颜^{1,2}, 曹庸^{1,2}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 广东省天然活性物工程技术研究中心, 广东广州 510642)

(3. 无限极(中国)有限公司, 广东广州 510000) (4. 广州绿萃生物科技有限公司, 广东广州 510663)

摘要: 本文利用反相高效制备液相色谱对酪蛋白磷酸肽(CPPs)进行初步分离, 根据色谱图峰形收集得到4个组分, 用分析型反相高效液相色谱进一步分离纯化组分F2, 得到亚组分P3, 低温减压浓缩回收溶剂, 冷冻干燥得到CPPs单体P3粉末。通过已知CPPs单体P3的氨基酸序列人工固相化学合成CPPs单体P3, 经质谱和高效液相色谱鉴定, 合成CPPs单体P3的分子量与天然单体分子量一致且纯度为98.13%。天然与合成CPPs单体P3的液相保留时间一致, 相同浓度条件下合成单体的紫外吸收显著高于天然单体, 可能与空间结构差异有关。经红外光谱和圆二色光谱分析, 天然与合成CPPs单体P3均含有 α -螺旋、 β -转角、 β -折叠和无规卷曲特征结构, 主要以 β -折叠-反平行式和无规卷曲形式存在, 但不同二级结构形式比例存在差异。天然与合成CPPs单体P3的 α -螺旋、 β -转角和无规卷曲比例存在显著差异。天然与合成CPPs单体P3浓度从2 mg/mL上升到4 mg/mL时, 天然单体P3不同形式二级结构变化较小, 主要由 α -螺旋和无规卷曲向 β -折叠-反平行式转变, 合成单体P3不同形式二级结构变化显著, 主要由 α -螺旋和 β -转角向 β -折叠-反平行式和无规卷曲转变。

关键词: 酪蛋白磷酸肽; 分离纯化; 合成; 红外光谱; 圆二色光谱

文章编号: 1673-9078(2017)10-110-116

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.10.017

Purification, Solid-phase Synthesis and Structural Differentiation of Casein Phosphopeptides Active Monomers

LIU Guo^{1,2}, SUN Sheng-wei^{1,2}, MIAO Jian-yin^{1,2}, LUO Zhen³, XIA Zu-meng³, LIU Fei⁴, GUO Bao-yan^{1,2}, CAO Yong^{1,2}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (2. Guangdong Province Engineering Research Center for Bioactive Natural Products, Guangzhou 510642, China) (3. Infinitus (China) Co., Ltd., Guangzhou 510000, China) (4. Greencream Biotech Co., Ltd, Guangzhou 510663, China)

Abstract: In this paper, the preliminary purification of casein phosphopeptides(CPPs) was investigated using preparative reverse phase high performance liquid chromatography. Four components were collected according to the peak shape of the chromatogram. The F2 component was further separated and purified by analytical RP-HPLC to obtain sub-component P3. The casein phosphopeptides active monomers P3 powder was collected by reduced pressure distillation and lyophilization to remove the solvent. The casein phosphopeptide monomers P3 were synthetically synthesized based on the amino acid sequence of P3. The molecular weight of synthesized P3 was uniform with the natural monomer and the purity was 98.13%, which was determined by Mass Spectrometry and High Performance Liquid Chromatography. The retention time of the natural and synthetic casein phosphopeptides monomer P3 was consistent, and the ultraviolet absorption of the synthesized monomer was much higher than that of the natural monomer, which could be related to the diversity of protein tertiary structure. There were α -helix, β -turn, β -sheet and random coil in the secondary structure of the natural and synthetic CPPs monomer P3 according to the analysis of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and circular dichroism. The synthesized and natural monomers were mainly in the form of antiparallel and random coil, but there were difference in the ratio of the α -helix, β -turn and random curl of natural

收稿日期: 2017-01-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31601474); 广东省自然科学基金项目(2016A030310442); 广东省教育厅科研项目(平台)(2013gjh0003)

作者简介: 刘果(1986-), 男, 在读博士, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 曹庸(1966-), 男, 教授, 博导, 研究方向: 天然产物与功能性食品开发

and synthetic CPPs monomer P3. The second structural change of natural monomer P3 changed small with the concentration of monomers from 2 mg/mL up to 4 mg/mL, which the α -helix and random coil were transformed to the antiparallel. The second structural of synthesized monomer P3 had a significant variation, which mainly transformed the α -helix and β -turn to the antiparallel and random coil.

Key words: casein phosphopeptides; purification; synthesis; FT-IR; circular dichroism

酪蛋白磷酸肽 (Casein Phosphopeptides) 简称 CPPs, 以牛乳酪蛋白为原料, 经单一酶或复合酶水解, 再经分离纯化而得到的含有磷酸丝氨酸基的生物活性多肽, 大量研究表明, 在动物小肠内 pH 呈中性到弱碱性的环境中, CPPs 能阻止磷酸钙沉淀的产生^[1], 使肠内溶解钙的量保持在较高水平, 从而促进钙的吸收和利用^[2,3], CPPs 还具有提高免疫力、促进体外受精和细胞融合, 以及抑制细菌等多种生理功能^[4]。随着钙强化剂的推广应用, CPPs 在日本、东南亚、欧洲和澳大利亚等地已被广泛应用于钙强化乳制品、果汁饮料、蛋白饮料和速溶饮品、运动食品、糖果、营养素补充剂以及防龋齿口香糖中。我国现在已经将 CPPs 作为食品添加剂广泛用于婴幼儿奶粉和钙铁锌等矿物质补充食品及营养保健食品中^[4]。

由于酪蛋白磷酸肽分子量大小、带电荷及亲水性等性质的差异, 可利用不同的分离纯化方法进行制备, 如盐析法、超滤法、电泳法、反相高效液相色谱法、凝胶色谱法、亲和层析法、离子交换色谱法和高速逆流色谱法等方法^[5]。

多肽是构成蛋白质的片段, 生物活性区别于蛋白质又不同于游离氨基酸, 具有独特的功能, 多肽的分子量、氨基酸一级结构以及构象等结构的不同决定了其生物活性的千差万别。研究表明, CPPs 分子中均含有相同的核心结构(-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-)^[6], CPPs 分布于 α S1-酪蛋白和 β -酪蛋白等牛乳蛋白的不同区域, 所以不同的酶作用于酪蛋白生成的 CPPs 的分子量不同, 其磷酸解离常数也不同^[7]。一些学者通过化学方法合成酪蛋白磷酸肽并对其免疫原性^[8]、抗原性^[8]和防龋活性^[9]进行研究, 冯凤琴等人合成 6 种含有不同数量和序列的磷酸丝氨酸基团的磷酸肽并评价该 6 种磷酸肽的体外钙结合能力, 结果表明磷酸基团的数量及所在序列位置是影响体外钙结合能力的重要因素, 6 个合成多肽中具有 2 个不连续的磷酸丝氨酸基团的活性最高^[10]。人工合成方法很难确保合成产物与天然产物空间结构的一致性, 可能造成多肽活性上的差异, 甚至丧失^[11]。赵铁华等人报道对合成的和生物化学方法提取的棕点湍蛙抗菌肽的抗菌作用进行分析, 结果合成抗菌肽对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌均有一定的杀菌作用, 但活性低于生物化学方法提取的天然产物, 人工合成抗菌肽与天然多肽比较活性的

部分丧失是否与其空间构型的改变有关尚需进一步探讨^[12]。目前合成酪蛋白磷酸肽与天然酪蛋白磷酸肽的结构差异及生物活性研究少有报道, 本文旨在研究酪蛋白磷酸肽活性单体的分离纯化、人工合成及对比天然与合成酪蛋白磷酸肽活性单体结构差异, 为酪蛋白磷酸肽构效关系的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 原料试剂与仪器

1.1.1 原料

高纯酪蛋白磷酸肽, 购自于广州绿萃生物科技有限公司; 合成酪蛋白磷酸肽单体, 购自于广州特立生物科技有限公司。

1.1.2 试剂

溴化钾光谱纯: 天津天光光学仪器有限公司; 三氟乙酸: aladdin 公司; 色谱级乙腈: 美国 Fisher 公司。

1.1.3 主要仪器设备

AL104 电子天平: 梅特勒-托利多公司; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器: 巩义市予华仪器有限公司; LC-10A 高效液相色谱仪: 岛津(中国)有限公司; R204B3 旋转蒸发器: 上海申生科技有限公司; 岛津制备液相: 岛津(中国)有限公司; Thermo ModulyoD 冷冻干燥机: 赛默飞世尔公司; UV-1700 紫外可见分光光谱仪: 岛津(中国)有限公司; VERTEX 70 傅立叶变换红外光谱仪: 德国 BRUKER 公司; Chirascan 圆二色光谱仪: 英国应用光物理公司。

1.2 方法

1.2.1 酪蛋白磷酸肽单体分离纯化

本实验利用制备液相分离酪蛋白磷酸肽单体, 反相 C18 色谱柱 (20 mm×450 mm), 填料 (10 μ m, 300 Å, Macherey Nagel, France), 紫外检测波长 215 nm, 高纯酪蛋白磷酸肽样品浓度: 250 mg/mL, 进样量: 1 mL (过 0.22 μ m 微孔滤膜), 流动相 A 水 (0.1%三氟乙酸), B 乙腈 (0.1%三氟乙酸), 流速 10 mL/min, 5%~18.5%流动相 B 为 22.5 min, 18.5%~30%流动相 B 为 62.5 min。

按制备液相谱图中的峰形收集酪蛋白磷酸肽各个组分, 50 °C 真空浓缩收集组分, 回收乙腈, 将每个组

分冻干, 利用高效液相分析型色谱分析每个组分的组成成分^[13], 利用面积归一化法计算酪蛋白磷酸肽单体纯度。液相条件: AQ-C18(200 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 水 (0.1%三氟乙酸), B 乙腈 (0.1%三氟乙酸), 检测波长 215 nm, 室温, 流速 1 mL/min, 样品浓度 2 mg/mL 进样体积 20 μL, 洗脱程序见下表。

表 1 酪蛋白磷酸肽分析型液相洗脱程序

Table 1 Analytical HPLC gradient of CPPs

时间/min	流动相 B 浓度/%
0.01	10
15.00	20
50.00	27
50.01	95
60.00	95
60.01	10
72.00	10

1.2.2 酪蛋白磷酸肽活性单体人工固相合成

根据酪蛋白磷酸肽活性单体氨基酸序列体外化学合成活性多肽单体 P3, 合成方法如下: 多肽从 C 端到 N 端方向合成, 先在树脂上挂第一个氨基酸, 称取 1 g 2-Cl 树脂于洁净干燥的反应管中, 加入适量 DMF, 活化 30 min 左右, 然后称取第一个氨基酸 Fmoc-Lys (Boc)-OH 0.2 mmol, DIEA 0.5 mL 加入到反应管中, DMF 做溶剂反应 5 h。反应完毕用 DMF 洗 4~6 次, 加入适量 DCM: 甲醇, 体积比为 1:1, 反应 1 h。反应完毕用 DMF 洗 4~6 次。然后用哌啶溶液脱掉氨基酸的 Fmoc, 脱两次共 30 min, 20 min+10 min。再用 DMF 洗 4 次, 甲醇洗 2 次, 取出少量树脂用茚三酮检测试剂检测, 检测为紫褐色, 即可进行下一步反应。

称取第二个氨基酸 Fmoc-Asp(tBu)-OH 0.6 mmol, HBTU 0.6 mmol 于反应管中, 加入 DIEA 0.5 mL, 反应 1 h, 用 DMF 洗 4~6 次, 取少量树脂用茚三酮检测试剂检测, 显无色, 然后加入哌啶溶液脱 Fmoc, 20 min+10 min, 然后用 DMF 洗 4 次, 甲醇洗两次, 取出少量树脂用茚三酮检测试剂检测, 检测为蓝色, 以下氨基酸合成方法同此段。最后用三氟乙酸切割液切割 2.5 h, 反应液抽滤, 得多肽的三氟乙酸溶液, 用乙醚沉淀, 离心, 然后再用乙醚洗 3~5 次, 得白色固体, 经高效液相色谱仪 HPLC 纯化, 冻干, 取少量使用 HPLC 和质谱仪分析。

HPLC 分析条件: 反相 C18 色谱柱 (Kromasil 100-5C18, 4.6 mm×250 mm, 5 micron), 洗脱时间 20 min, 检测波长 220 nm, 流速 1 mL/min, 进样体积 10 μL, 流动相 A 水 (0.1%三氟乙酸), B 乙腈 (0.1%三氟乙酸), 18%~38%流动相 B 洗脱 20 min。

质谱分析条件如下: 流速 0.2 mL/min, 分析时间 1 min, 流动相 A 水 (0.1%甲酸), B 乙腈 (0.1%甲酸)。

1.2.3 天然和合成酪蛋白磷酸肽单体 HPLC 分析方法

酪蛋白磷酸肽单体 HPLC 分析参考方法^[13], 方法步骤如下, 准确称量 1 mg 酪蛋白磷酸肽活性单体 P3, 用去离子水配制成浓度为 2 mg/mL 的水溶液, 震荡直至酪蛋白磷酸肽单体完全溶解, 过 0.22 μm 滤头, 色谱柱 AQ-C18(200 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 水 (0.1%三氟乙酸), B 乙腈 (0.1%三氟乙酸), 检测波长 215 nm, 室温, 流速 1 mL/min, 样品浓度 2 mg/mL 进样体积 20 μL, 洗脱程序同表 1。

1.2.4 天然和合成酪蛋白磷酸肽单体红外吸收光谱检测方法

红外光谱测定参考方法^[14]并做适当修改, 步骤简要描述如下, 准确称量酪蛋白磷酸肽单体 P3 粉末 1 mg 与干燥的 KBr 粉末 100 mg (预先放置于马弗炉中 200 °C 干燥 10 h) 混合后置于玛瑙研钵中研磨过筛, 过筛后的粉末在红外灯下压片, 采用 KBr 压片, 波数范围 400~4000 cm⁻¹, 扫描方式采用透过率测定活性肽的红外光谱。

1.2.5 天然和合成酪蛋白磷酸肽单体圆二色检测方法

圆二色光谱测定参考方法^[15]并做适当修改, 用去离子水配制 2 mg/L 和 4 mg/L 的酪蛋白磷酸肽单体 P3 溶液, 涡旋振荡, 石英样品池厚度为 0.2 mm, 波长范围设置为 190~260 nm, 检测温度为 25 °C, 扫描速度 100 nm/min, 每个样品重复扫描 3 次并以去离子水为空白样品进行对照, 测定结果经平滑处理, 系统 Chirascan 软件计算出二级结构含量。

1.2.6 数据统计与分析

采用 SPSS 17.0 软件进行显著性分析, 实验数据以平均值±标准偏差表示, 不同的字母代表显著差异 ($p < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 酪蛋白磷酸肽活性单体分离纯化

目前, 已报道许多酪蛋白磷酸肽分离方法, 冯凤琴等学者以酪蛋白为原料, 通过有控制的酶解以及离子交换和凝胶过滤技术制得 N/P (摩尔比) 不同的酪蛋白磷酸肽^[16], 焦宇知等采用纳滤工艺生产所得 CPPs, 氨基酸分析、Sephadex-G15 凝胶层析和 HPLC 分析结果表明纳滤能透过部分的氨基酸和短肽, 从而改善 CPPs 产品质量^[17]。学者 Muhammad Ali Naqvi 利

用反相高效液相色谱进行酪蛋白磷酸肽的分离纯化[18]。

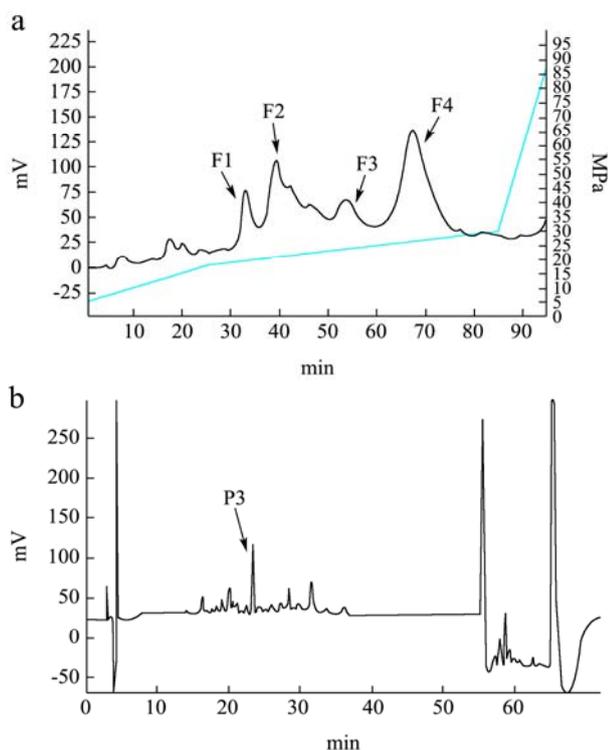


图1 酪蛋白磷酸肽制备液相色谱图(a), 酪蛋白磷酸肽单体 P3 液相色谱图(b)

Fig.1 Preparative liquid chromatogram of CPPs (a), liquid chromatogram of CPPs monomer P3 (b)

由图 1a 可知,酪蛋白磷酸肽经过制备液相色谱仪分离得到 F1、F2、F3 和 F4 共 4 个组分,组分 F2 经过分析型液相色谱仪进一步分离,从图 1b 发现 F2 有较多的亚组分,但亚组分 P3 含量最高,利用分析型液相收集亚组分 P3,经质谱分析 P3 氨基酸序列为 DIG(pS)E(pS)TEDQAMEDIK,包括两个磷酸丝氨酸结构,由 16 氨基酸组成,分子量 1927.53,在酪蛋白上的肽段 $\alpha s1$ (58~73),该结果与实验室前期研究制备的酪蛋白磷酸肽单体结构一致,且在 Caco-2 细胞评价模型中 P3 具有较高的钙转运活性^[13]。低温减压浓缩回收乙腈,冷冻干燥得到酪蛋白磷酸肽活性单体 P3。利用高效分析型液相色谱仪检测并用面积归一化法计算 CPPs 单体 P3 纯度均高于 90%, -20 °C 冷冻保藏直到分析。

2.2 酪蛋白磷酸肽活性单体人工固相合成

人工合成法主要有化学合成法和基因工程法,这两种方法都需建立在已知多肽氨基酸序列的基础上,本实验选择固相合成方法得到合成酪蛋白磷酸肽单体 P3。

由图 2b 可知合成酪蛋白磷酸肽单体 P3 经质谱仪

检测分子量与天然酪蛋白磷酸肽单体的分子量一致,说明合成的酪蛋白磷酸肽 P3 氨基酸序列与天然 P3 氨基酸序列一致。由图 2a 通过高效液相色谱图面积归一化法计算得出合成酪蛋白磷酸肽单体 P3 纯度为 98.13%。

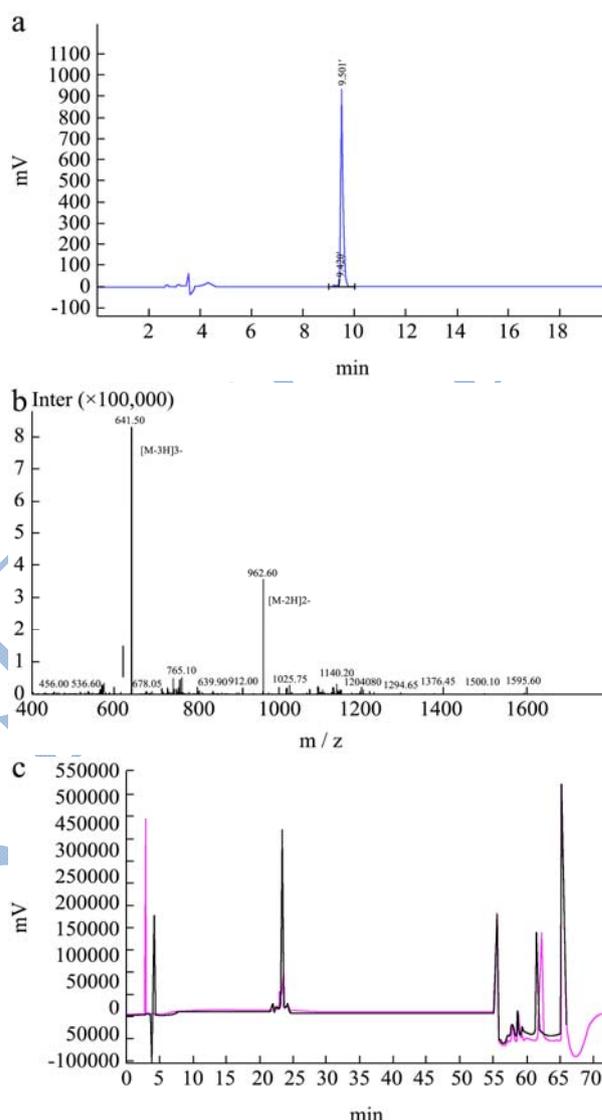


图2 合成酪蛋白磷酸肽单体 P3 液相色谱图(a), 合成酪蛋白磷酸肽单体 P3 质谱图(b), 天然与合成酪蛋白磷酸肽单体 P3 液相色谱图(c)

Fig.2 Liquid chromatogram of synthetic CPPs monomer P3(a), mass spectrum of synthetic of CPPs monomer P3(b), liquid chromatogram of natural and synthetic of CPPs monomer P3(c)

注: c 图中红色表示天然,黑色表示合成。

2.3 天然和合成酪蛋白磷酸肽单体 HPLC 分析

从图 2c 得知,把天然酪蛋白磷酸肽单体 P3 做为

内标添加在合成单体充分混匀后的液相图谱只出现一个峰,说明天然与合成酪蛋白磷酸肽单体具有相同的保留时间,佐证了合成酪蛋白磷酸肽单体 P3 与天然酪蛋白磷酸肽单体 P3 具有相同的一级结构。有意思的是,图 2c 可见相同浓度的 2 mg/mL 合成单体 P3 的峰面积为 5142713 mV,而天然单体 P3 的峰面积为 1046798 mV,合成 P3 的峰面积接近于天然 P3 的 5 倍,两者的紫外吸收呈显著差异,可能的原因是合成与天然酪蛋白磷酸肽 P3 的空间结构存在差异,具有紫外吸收的基团暴露程度不同,导致合成和天然单体的紫外吸收差异。

2.4 天然和合成酪蛋白磷酸肽单体红外光谱

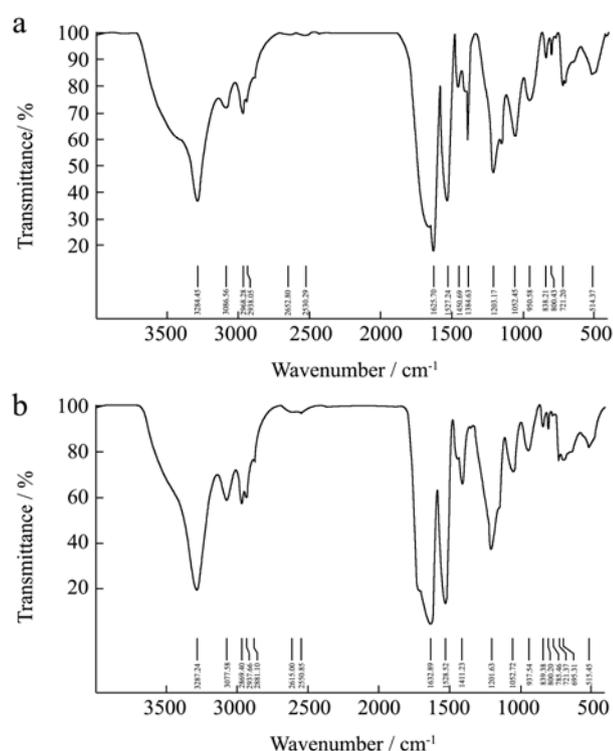


图 3 天然酪蛋白磷酸肽单体 P3 红外光谱图 (a), 合成酪蛋白磷酸肽单体 P3 红外光谱图 (b)

Fig.3 FT-IR spectra of natural CPPs monomer P3 (a) and synthetic CPPs monomer P3 (b)

红外光谱分析中,常用酰胺 I 带和酰胺 III 带评价肽的空间结构信息。酰胺谱带 I 带主要是 C=O 的伸缩振动 ($1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$),对于研究二级结构最有价值;而酰胺谱带 III 带主要是 C-N 和 C-O 的伸缩振动 ($1200\sim 1330\text{ cm}^{-1}$),在这一波数范围内存在 α -螺旋、 β -折叠和无规卷曲等吸收峰重叠。酰胺谱带 I 带 ($1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$) 的振动频率取决于 C=O 和 N-H 之间的氢键性质, 1612 、 1621 、 1631 和 1641 cm^{-1} 为 β -折叠的特征吸收峰; 1650 和 1659 cm^{-1} 为 α -螺旋的特征吸收峰; 1659 和 1668 cm^{-1} 为无规卷曲的特征吸收

峰; 1678 和 1688 cm^{-1} 为 β -转角的特征吸收峰。酰胺谱带 III 带 ($1200\sim 1330\text{ cm}^{-1}$) 中 1238 、 1250 、 1262 和 1274 cm^{-1} 为 β -折叠的特征吸收峰; 1274 和 1287 cm^{-1} 为 β -转角的特征吸收峰; 1299 和 1311 cm^{-1} 为 α -螺旋的特征吸收峰; 1311 、 1323 和 1336 cm^{-1} 为无规卷曲的特征吸收峰^[19,20]。

从图 3a 和 3b 可以发现,天然与合成酪蛋白磷酸肽单体 P3 在 $2800\sim 3500\text{ cm}^{-1}$ 均有较强的吸收峰,通过数据分析发现该波数范围主要为 N-H 和 O-H 的伸缩振动。图 3b 表明天然酪蛋白磷酸肽单体 P3 红外光谱在 1262 cm^{-1} 强吸收峰证明存在 β -折叠结构,在 1678 和 1688 cm^{-1} 强吸收峰证明存在 β -转角结构,在 1659 cm^{-1} 吸收峰证明存在 α -螺旋特征结构,在 1668 cm^{-1} 吸收峰证明存在无规则卷曲特征结构。合成酪蛋白磷酸肽单体 P3 红外光谱在 1632 cm^{-1} 强吸收峰证明存在 β -折叠结构,在 1688 cm^{-1} 强吸收峰证明存在 β -转角结构,在 1659 cm^{-1} 吸收峰证明存在 α -螺旋特征结构,在 1668 cm^{-1} 强吸收峰证明存在无规则卷曲特征结构。天然与合成酪蛋白磷酸肽单体 P3 均具有 α -螺旋、 β -转角、 β -折叠和无规卷曲特征蛋白质二级结构。

2.5 天然和合成酪蛋白磷酸肽单体圆二色光谱

圆二色性是研究溶液中蛋白质分子构象的一种方便而且广泛使用的方法。表 2 圆二色谱分析表明,天然与合成酪蛋白磷酸肽单体 P3 二级结构由 α -螺旋、 β -转角、 β -折叠和无规卷曲组成,该结果与 FT-IR 分析的结构基本一致。二级结构中 α -螺旋、 β -转角、 β -折叠-平行式成分比例较低,主要以无规卷曲和 β -折叠-反平行式形式存在。

天然与合成酪蛋白磷酸肽单体 P3 为低浓度 2 mg/mL 时,合成酪蛋白磷酸肽单体 P3 中 α -螺旋和 β -折叠-反平行式比例显著高于天然酪蛋白磷酸肽单体 P3 中的比例,合成酪蛋白磷酸肽单体 P3 中无规卷曲比例显著低于天然酪蛋白磷酸肽单体 P3 中的比例,而 β -转角和 β -折叠比例无显著差异。

天然与合成酪蛋白磷酸肽单体 P3 为高浓度 4 mg/mL 时,合成酪蛋白磷酸肽单体 P3 中 β -折叠-反平行式和 β -折叠-平行式比例显著高于天然酪蛋白磷酸肽单体 P3 中的比例,合成酪蛋白磷酸肽单体 P3 中 α -螺旋和 β -转角比例显著低于天然酪蛋白磷酸肽单体 P3 中的比例,而无规卷曲比例无显著差异。

天然酪蛋白磷酸肽单体 P3 浓度从 2 mg/mL 上升到 4 mg/mL 时,可以发现天然酪蛋白磷酸肽 P3 中不

表 2 天然与合成酪蛋白磷酸肽 P3 单体圆二色光谱结果

Table 2 Secondary composition of natural and synthetic of CPPs monomer P3 derived from circular dichroism spectra

来源	浓度/(mg/mL)	α -螺旋/%	β -折叠-反平行式/%	β -折叠-平行式/%	β -转角/%	无规则卷曲/%
天然	2.00	7.50±0.01 ^b	44.30±0.05 ^a	3.90±0.02 ^a	16.90±0.04 ^c	30.70±0.04 ^d
	4.00	6.10±0.03 ^a	49.00±0.02 ^c	3.70±0.05 ^b	16.60±0.06 ^b	29.00±0.07 ^c
合成	2.00	13.00±0.04 ^d	45.00±0.07 ^b	5.10±0.03 ^b	17.40±0.03 ^d	25.60±0.02 ^a
	4.00	8.70±0.05 ^c	55.40±0.02 ^d	5.40±0.05 ^c	12.20±0.01 ^a	28.00±0.04 ^b

注: 不同的字母代表显著差异($p < 0.05$)。

同形式的二级结构比例变化不大, α -螺旋比例由 7.50% 下降到 6.10%, β -转角比例由 16.90% 下降到 16.60%, β -折叠-反平行式比例由 44.30% 上升到 49.00%, 主要由 α -螺旋和无规则卷曲向 β -折叠-反平行式转变。合成酪蛋白磷酸肽 P3 中不同形式的二级结构比例变化显著, α -螺旋比例由 13.00% 下降到 8.70%, β -转角比例由 17.40% 下降至 12.20%, β -折叠-反平行式比例由 45.00% 上升到 55.40%, 无规则卷曲比例由 25.60% 上升到 28.00%。结果说明合成单体 P3 浓度从 2 mg/mL 上升到 4 mg/mL 时, 其二级结构主要由 α -螺旋和 β -转角向 β -折叠-反平行式和无规则卷曲转变。

3 结论

3.1 酪蛋白磷酸肽单体分离纯化

酪蛋白磷酸肽经过反相高效制备液相色谱进行初步分离, 根据液相色谱图洗脱峰形收集得到 4 个组分 (F1、F2、F3 和 F4), 用反相高效分析型液相进一步分离纯化组分 F2, 收集亚组分 P3, 低温真空浓缩回收溶剂, 冷冻干燥得到 CPPs 单体 P3 粉末, 面积归一化法计算 CPPs 单体 P3 纯度高于 90%。

3.2 酪蛋白磷酸肽活性单体化学合成

根据 CPPs 单体 P3 的氨基酸序列。利用已知 P3 的氨基酸序列人工化学合成 CPPs 单体 P3, 经质谱检测合成 CPPs 单体 P3 的分子量与天然单体分子量一致, 进一步经 HPLC 分析, 按照面积归一化法计算得知合成 CPPs 单体 P3 纯度为 98.13%, 说明根据已知氨基酸序列合成的 CPPs 单体 P3 无误。

3.3 天然和合成酪蛋白磷酸肽单体结构分析

相同浓度的天然与合成 CPPs 单体 P3, 合成单体的紫外吸收显著高于天然单体, 可能与单体 P3 的空间结构差异有关, 红外光谱及圆二色光谱结果均说明天然与合成 CPPs 单体 P3 均含有 α -螺旋、 β -转角、 β -折叠和无规则卷曲特征结构, α -螺旋、 β -转角、 β -折叠-

平行式形式比例较低, 主要以 β -折叠-反平行式和无规则卷曲形式存在, 天然与合成 CPPs 单体 P3 在不同浓度条件下的不同形式的二级结构比例也存在显著差异。浓度从 2 mg/mL 上升到 4 mg/mL 的 α -螺旋和 β -转角比例较低, 主要以 β -折叠和无规则卷曲形式存在, 天然与合成 CPPs 单体 P3 浓度从 2 mg/mL 上升到 4 mg/mL 时, 天然单体 P3 不同形式二级结构变化较小, 主要由 α -螺旋和无规则卷曲向 β -折叠-反平行式转变, 合成单体 P3 不同形式二级结构变化显著, 主要由 α -螺旋和 β -转角向 β -折叠-反平行式和无规则卷曲转变。天然与合成 CPPs 单体 P3 的促钙吸收活性以及结构与生物活性之间的关系需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Donida B M, Mrak E, Gravaghi C, et al. Casein phosphopeptides promote calcium uptake and modulate the differentiation pathway in human primary osteoblast-like cells [J]. Peptides, 2009, 30(12): 2233-2241
- [2] Perego S, Cosentino S, Fiorilli A, et al. Casein phosphopeptides modulate proliferation and apoptosis in HT-29 cell line through their interaction with voltage-operated L-type calcium channels [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2012, 23(7): 808-16
- [3] Perego S, Zabeo A, Marasco E, et al. Casein phosphopeptides modulate calcium uptake and apoptosis in Caco-2 cells through their interaction with the TRPV6 calcium channel [J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(2): 847-857
- [4] 王玉莹, 陈锡威, 冯凤琴, 等. 酪蛋白磷酸肽的研究进展 [J]. 食品工业, 2014, 35(5): 204-208
WANG Yu-ying, CHEN Xi-wei, FENG Feng-qin, et al. Research progress in casein phosphopeptides [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(5): 204-208
- [5] 葛平珍, 周才琼. 食源性活性肽制备与分离纯化的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(4): 363-368
GE Ping-zhen, ZHOU Cai-qiong. Research progress in the preparation, separation and purification of bioactive peptide derived from food [J]. Science and Technology of Food

- Industry, 2014, 35(4): 363-368
- [6] Miquel E, Farré R. Effects and future trends of casein phosphopeptides on zinc bioavailability [J]. Trends in Food Science & Technology, 2007, 18(3): 139-143
- [7] 孙延春. 酪蛋白磷酸肽应用研究进展[J]. 中国乳品工业, 2011, 39(2): 53-55
SUN Yan-chun. Research application of casein phosphopeptides [J]. Daily Industry, 2011, 39(2): 53-55
- [8] Zhang F M, H Otani. Immunogenicity and antigenicity of casein phosphopeptides [J]. Milchwissenschaft, 2003, 58(1-2): 9-13
- [9] Reynolds E C, Cain C J, Webber E L, et al. Anticariogenicity of calcium phosphate complexes of tryptic casein phosphopeptides in the rat [J]. Journal of Dental Research, 1995, 74(6): 1272-1279
- [10] Zong H, Peng L J, Zhang S S, et al. Effects of molecular structure on the calcium-binding properties of phosphopeptides [J]. European Food Research and Technology, 2012, 235(5): 811-816
- [11] 程玉洁. 棕点湍蛙抗微生物短肽的合成及其抗菌作用研究 [D]. 石家庄: 河北师范大学, 2011
CHENG Yu-jie. Synthesis and antibacterial activity of palm point turbulent frog antimicrobial peptides [D]. Shijiazhuang: Hubei Normal University, 2011
- [12] 赵铁华, 程玉洁, 李哲. 合成棕点湍蛙抗菌肽的抗菌活性评价 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(9): 1292-1294
ZHAO Tie-hua, CHENG Yu-jie, LI Zhe. Antibacterial activity evaluation of palm point turbulent frog antimicrobial peptides [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2011, 27(9): 1292-1294
- [13] Cao Y, Miao J Y, Liu G, et al. Bioactive peptides isolated from casein phosphopeptides enhance calcium and magnesium uptake in Caco-2 cell monolayers [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(11): 2307-2314
- [14] Yin C, Yang L, Zhao H, et al. Improvement of antioxidant activity of egg white protein by phosphorylation and conjugation of epigallocatechin gallate [J]. Food Research International, 2014, 64: 855-863
- [15] Iacomino G, Fierro O, Sabato D A, et al. Structural analysis and Caco-2 cell permeability of the celiac-toxic A-gliadin peptide 31-55 [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(5): 1088-1096
- [16] 冯凤琴, 许时婴, 王璋. 酪蛋白磷酸肽功能性质的体外研究 [J]. 食品与发酵工业, 1997, 23(6): 1-5
FENG Feng-qin, XU Shi-ying, WANG Zhang. Study on the functional properties of casein phosphopeptides *in vitro* [J]. Food and Fermentation Industries, 1997, 23(6): 1-5
- [17] 焦宇知, 王璋, 高 N/P(摩尔比)酪蛋白磷酸肽生产工艺及初步分离纯化研究 [J]. 食品科技, 2006, 31(1): 27-30
JIAO Yu-zhi, WANG Zhang. Investigation on production and separation of CPP with higher N/P (molar ratio) [J]. Food Science and Technology, 2006, 31(1): 27-30
- [18] Naqvi M A, Singh J, Han E, et al. Purification and identification of β -casein phosphopeptide (1-25) [J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(10): 7803-7808
- [19] Murariu M, Dragan E S, Drochioiu G, et al. IR, MS and CD investigations on several conformationally-different histidine peptides [J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2009, 15(4): 303-311
- [20] Carbonaro M, Nucara A. Secondary structure of food proteins by fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region [J]. Amino Acids, 2010, 38(3): 679-690