

牦牛乳酪蛋白磷酸肽纯化工艺优化及其促钙吸收作用

刘静雅¹, 王泽¹, 郑亮², 李咪咪¹, 陈炼红^{1*}

(1. 西南民族大学食品科学与技术学院, 四川成都 610041)

(2. 炉霍康巴圣德牦牛产业有限公司, 四川甘孜 626500)

摘要: 为了探究牦牛乳酪蛋白磷酸肽 (Casein Phosphopeptide, CPP) 产品性质和持钙能力, 该试验以牦牛乳酪蛋白为原料, 采用胰蛋白酶酶解, 静态吸附试验确定洗脱剂, 同时分析上样量、上样流速、洗脱液浓度对 CPP 纯化工艺的影响; 测定纯化后 CPP 的基本成分、功能性质、体外抑制磷酸钙和亚铁离子沉淀能力; 建立低钙小鼠模型, 以体质量、脏器指数、血清生化、股骨指数、骨密度和骨钙为指标, 探究 CPP 在小鼠体内促钙吸收能力。结果表明: 以 0.2 mol/L 稀盐酸为洗脱液, 上样流速 3 mL/min, 上样量 100 mL 条件下获得的 CPP 纯化效果最优, 其氮磷摩尔比为 6.8, 磷回收率为 95.5%, 谷氨酸含量 18.55%, 丝氨酸含量 6.01%; 体外促钙实验表明纯化后 CPP 能有效阻止磷酸钙、亚铁离子沉淀; 动物实验结果表明: 经 28 d 喂养, 所有小鼠内脏指数均在合理范围内, 纯化后 CPP 无慢性毒性, 中高剂量组血钙、血磷含量显著高于模型组 ($P < 0.05$), 碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase, ALP) 值极显著低于模型组 ($P < 0.01$), 高剂量组股骨指数显著高于碳酸钙组 ($P < 0.05$), CPP 中、高剂量组骨钙、骨密度显著高于模型组 ($P < 0.05$)。综上, 该实验可为牦牛乳功能性食品开发提供理论依据, 为后续牦牛乳生物活性肽的相关研究提供参考。

关键词: 牦牛乳; 酪蛋白磷酸肽; 纯化工艺; 促钙吸收

文章编号: 1673-9078(2024)07-184-192

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.7.0774

Optimization of the Purification Process of Yak Casein Phosphopeptide and Its Calcium Absorption-promoting Effect

LIU Jingya¹, WANG Ze¹, ZHENG Liang², LI Mimi¹, CHEN Lianhong^{1*}

(1. College of Food Science and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

(2. Luhuo Kangbashengde Yak Industry Co. Ltd., Ganzi 626500, China)

Abstract: To investigate the properties and calcium-holding capacity of yak casein phosphopeptide (CPP), this experiment was carried out using yak casein as the raw material, with trypsin being used for enzymatic hydrolysis. Static adsorption test was performed to determine the eluent, and the effects of sample amount, sample flow rate and eluent concentration on the purification process of CPP. The basic composition, functional properties, and *in vitro* inhibitory

引文格式:

刘静雅,王泽,郑亮,等.牦牛乳酪蛋白磷酸肽纯化工艺优化及其促钙吸收作用[J].现代食品科技,2024,40(7):184-192.

LIU Jingya, WANG Ze, ZHENG Liang, et al. Optimization of the purification process of yak casein phosphopeptide and its calcium absorption-promoting effect [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(7): 184-192.

收稿日期: 2023-06-27

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项 (2023NYXXS069)

作者简介: 刘静雅 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: lji_9876@163.com

通讯作者: 陈炼红 (1967-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 民族食品资源开发, E-mail: lianhong_chen@163.com

capacity against calcium phosphate and ferrous ion precipitation of purified CPP were examined. A low-calcium mouse model was established, and the ability of CPP to promote calcium absorption in mice was investigated using body weight, organ index, serum biochemical parameters, femur index, bone density and bone calcium as the indicators. The experimental results showed that the best purification effect on the CPP was obtained under the following conditions: 0.2 mol/L dilute hydrochloric acid as the eluent, 3 mL/min as the loading flow rate, and 100 mL as the loading volume, leading to a nitrogen to phosphorus molar ratio of 6.8, a phosphorus recovery of 95.5%, a glutamic acid content of 18.55% and a serine content of 6.01%. *In vitro* calcium promotion experiments showed that the purified CPP could effectively prevent the precipitation of calcium phosphate and ferrous ions. The results of animal experiments showed that after 28 d of feeding, the organ indices of all mice were within a reasonable range. After purification, CPP showed no chronic toxicity. The medium- and high-dose groups had significantly higher blood calcium and phosphorus levels than those of the model group ($P < 0.05$), and had extremely significantly lower alkaline phosphatase (ALP) values than those in the model group ($P < 0.01$). The femoral bone index in the high-dose group was significantly higher than that in the calcium carbonate group ($P < 0.05$). The bone calcium and bone density of the medium- and high-dose CPP groups were significantly higher than those of the model group ($P < 0.05$). In conclusion, this experiment can provide a theoretical basis for the development of functional yak milk foods and a reference for the subsequent research on yak milk's bioactive peptides.

Key words: yak milk; casein phosphopeptide; purification technology; calcium absorption promotion

牦牛是青藏高原特色畜种,因其生活的地理环境独特,赋予牦牛乳口感丰富、品质优良的特点^[1]。与普通牛乳相比,牦牛乳营养成分含量更高、更全面,蛋白质含量比牛乳高约 50%,总氨基酸含量约为牛乳两倍^[2]。牦牛乳中酪蛋白(Casein, CN)占总蛋白质含量 80%^[3],其中 β -CN 比牛乳含量高 10%^[4], β -CN 更容易被人体消化吸收^[5]。

目前,已有诸多学者对牦牛乳及其制品中的抗氧化肽、降血压肽和抗菌肽等生物活性肽进行研究。吴登宇等^[6]建立了 HEK-293 细胞氧化损伤模型,探究 5 条牦牛乳酪蛋白抗氧化肽对损伤细胞的影响,验证了牦牛乳抗氧化肽对氧化损伤细胞有积极的保护作用。宋雪梅等^[7]从牦牛乳干酪中提取出具有血管紧张素转化酶抑制活性的水溶性多肽。Pei 等^[8]从加工后废弃的牦牛乳中分离出抗菌肽 RVMFKWA 和 KVISM1,其中 RVMFKW 可抑制部分革兰氏阳性细菌生长, KVISM1 对部分细菌、真菌生长有抑制作用。

酪蛋白磷酸肽是 α_{s1} -CN、 α_{s2} -CN、 β -CN 经过蛋白酶酶解、分离得到的生物活性肽,由于其具有特殊负电荷结构^[9],可以作为钙、镁、锌、铁等离子体的载体^[10]。CPP 结合铁离子能力与 CPP 浓度、离子强度、pH 和温度等因素相关^[11],持钙能力与水解度、添加量、纯度成正比^[12],刘果^[13]探究了 CPP 单体 P5 对大鼠体内钙吸收的影响,结果表明 P5 有利于骨钙的沉积和骨骼的生长, CPP 的补充能有效促进大鼠对钙的吸收。CPP 还可以结合亚铁离子以及

螯合芬顿反应所产生的羟基自由基,达到体外抗氧化活性的能力^[14]。

目前,未见对于牦牛乳源 CPP 的相关研究,为此,本研究以牦牛乳酪蛋白为原料,制备纯化 CPP,并探究其最佳纯化工艺、体外持钙能力与体内促钙吸收的活性,为牦牛乳功能性食品开发提供理论依据,为后续牦牛乳生物活性肽的相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂

牦牛乳酪蛋白,炉霍康巴圣德牦牛产业有限公司;胰蛋白酶,德国 BioFroxx 公司;717 强碱性阴离子树脂,成都硕博研创有限公司;血清钙试剂盒、血清磷试剂盒,上海酶联生物科技有限公司;血清碱性磷酸酶试剂盒,南京建成生物工程研究所;钙标准溶液,美国 Inorganic ventures 公司;其余所用试剂均为分析纯。

实验动物:昆明(KM)小鼠,4 周龄雄性,成都达硕实验动物有限公司(许可证号:SCXK(川)2020-030 通过西南民族大学动物伦理委员会审核);普通饲料、低钙纯化饲料(参照 AIN-93 纯化饲料配方标准制备),南京协同生物技术有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

PHS-3C 型 pH 计,上海仪电科学仪器股份有

限公司；5804R 型冷冻离心机，德国 Eppendorf 公司；UV-6100 分光光度计，上海美普达公司；1.6 cm×50 cm 离子交换层析柱，AKTA 低压层析系统，上海闪谱专业有限公司；多功能电子蠕动泵，阿尔维勒（上海）流体有限公司；集热式恒温加热磁力搅拌器，上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司；ReadMax1900 型光吸收全波长酶标仪，上海闪谱生物科技有限公司；PARAMETER 双能 X 射线骨密度仪，美国 kubtec 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 粗酪蛋白磷酸肽制备方法

称取 110 g 牦牛乳酪蛋白，溶于 1 L 去离子水，用 1 mol/L NaOH 将溶液 pH 值调至 8.0，再加入 4 000 U/g 胰蛋白酶，将其搅拌均匀，在 55 °C 下酶解 4 h 得到酶解液，再置于 90 °C 灭酶 10 min。参照 GB 31617-2014 钡-乙醇法^[15]得到含 CPP 沉淀，在 -55 °C 0.08 MPa 条件下冷冻干燥 12 h，得到粗 CPP。

1.2.2 CPP 纯化及其工艺条件优化

1.2.2.1 离子交换树脂的预处理

参考解冠华^[16]的方法并加以修改，采用 2 mol/L 的 NaOH 和 HCl 处理，顺序为 NaOH → 去离子水 → HCl → 去离子水。

1.2.2.2 静态吸附解吸法确定最佳洗脱剂

参考朱樱^[17]的方法并加以修改，取 1 g 预处理的树脂 2 份，加入 20 mL 质量分数为 5% 的粗 CPP 溶液，25 °C、250 r/min 条件下用磁力搅拌器搅拌混合，每 5 min 吸取一次清液，在 280 nm 处对其进行吸光值测定，吸光值达到稳定后，将树脂过滤后分别倒入锥形瓶，加入 0.2 mol/L 的 NaOH 和 HCl 两种洗脱液，250 r/min 恒温解吸 10 h 后，对吸附液和解吸液中的 N 和 P 的质量分数进行测量，得到最佳洗脱剂。

1.2.2.3 动态吸附解吸法确定纯化工艺

在层析柱中装入 20 g 预处理的树脂，参考郑越萍^[18]的方法进行湿法装柱。

上样量对吸附效果的影响：分别配制质量分数为 5% 的肽液 75、100、125、150 mL，上样至 717 强碱性阴离子树脂，固定流量 1.0 mL/min，盐酸洗脱液浓度 0.2 mol/L，回收样液，分别测定其中磷的回收率和氮磷摩尔比，考察不同上样量对 CPP 纯化的影响。

样液流速对吸附效果的影响：固定上样浓度

为 5%，洗脱液浓度 0.2 mol/L，以最佳上样量上样至 717 强碱性阴离子树脂，分别以 1.0、2.0、3.0、4.0 mL/min 的流量通过树脂，收集洗脱液，分别测定其中磷的回收率和氮磷摩尔比，考察不同上样流速对 CPP 纯化的影响。

洗脱液浓度对解吸效果的影响：以最佳上样量、上样流速上样，当树脂吸附完全后，用一倍体积蒸馏水通柱洗去酪蛋白非磷酸肽和无机盐等未吸附的杂质，再分别用 0.15、0.20、0.25、0.30 mol/L 的 HCl 溶液作为洗脱剂通过树脂，收集洗脱液，分别测定其中磷的回收率和氮磷摩尔比，考察不同洗脱液浓度对 CPP 纯化的影响。

1.2.2.4 CPP 基本成分的测定

对最优纯化工艺制备的 CPP 进行基本成分测定，水分含量采用水分测定仪进行测定；灰分采用燃烧法^[19]进行测定；蛋白质含量采用凯氏定氮法^[20]进行测定；磷含量采用钼蓝分光光度法^[21]进行测定；氨基酸组成及含量采用氨基酸自动分析仪进行测定。

1.2.2.5 CPP 抑制磷酸钙沉淀的测定

pH-STAT 法^[22]测定 CPP 对磷酸钙沉淀的抑制作用，固定反应体系 100 mL，温度维持在 37 °C，分别加入 0.1 g/L 的 CPP 溶液，8 mmol/L 的 NaH₂PO₄，8 mmol/L 的 CaCl₂，在反应环境中 Ca:P=1:1，（磷是由 NaH₂PO₄ 提供的具有不同离解状态的磷酸根中的磷），立即加入浓度为 0.05 mol/L 的 NaOH 溶液，将溶液 pH 值调节到 8.0，每 5 min 记录一次 NaOH 消耗量，使溶液 pH 值保持在 8.0，以不加 CPP 的溶液体系为空白，观察沉淀出现时间，以时间为横坐标，NaOH 消耗量为纵坐标制图。

1.2.2.6 CPP 阻止亚铁离子沉淀的测定

方法同 1.2.2.5，反应体系环境固定 100 mL，37 °C 恒温，分别加入 0.1 g/L 的 CPP 溶液，8 mmol/L 的 FeSO₄，8 mmol/L 的 CaCl₂，使反应环境中 Ca:Fe=1:1，立刻加入浓度为 0.05 mol/L 的 NaOH 溶液将溶液 pH 值调至 8.0，每 5 min 记录一次 NaOH 消耗量，以观测到的沉淀析出时间为横坐标，以 NaOH 的消耗量作为纵坐标绘制曲线。

1.2.3 CPP 促进钙吸收的体内活性实验

1.2.3.1 动物试验分组

KM 小鼠 7 d 适应性喂养结束后称重，按体质量随机分为 6 组，每组 7 只，自由摄食饲料，按照表 1 饲喂方式连续灌胃 42 d，灌胃体积为 1 mL/100 g，

空白组、模型组保证相同的外界刺激，其余四组在饲喂低钙饲料的基础上，参考 60 kg 成人每日需摄入 800 mg 钙，即 13.3 mg/(kg bw·d)，剂量为 1.5 倍灌胃碳酸钙。试验期间每 7 d 称重 2 次，记录体质量增长及饲料摄入情况，饲养笼定期清洗，消毒，12 h 明暗交替。

表 1 试验小鼠分组

Table 1 Experimental mice were grouped				
组号	分组	饲喂方式	灌胃质量/(mg/kg)	
			CaCO ₃	CPP
1	空白组	正常钙饲料	—	—
2	模型组	低钙饲料	—	—
3	CaCO ₃ 组	低钙饲料	19.95	0.00
4	CPP 低剂量组	低钙饲料	19.95	19.95
5	CPP 中剂量组	低钙饲料	19.95	39.90
6	CPP 高剂量组	低钙饲料	19.95	79.80

1.2.3.2 体质量测定

每 7 d 称重并记录，称重前禁食 12 h，12 h 后天平秤量体质量，计算增重率。

1.2.3.3 脏器指数测定

42 d 喂养结束后各组小鼠禁食 12 h，摘眼球取血后断头处死。解剖小鼠摘取脏器计算脏器指数。脏器指数计算公式为：

$$D = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

D ——脏器指数，%；

m_1 ——小鼠内脏质量，g；

m_2 ——小鼠体质量，g。

1.2.3.4 小鼠血清中钙、磷、碱性磷酸酶含量测定

试验结束前禁食 12 h，收集小鼠眼球血，在室温下静置 30 min，4 °C 3 500 r/min 离心 15 min，获得血清，严格按照试剂盒说明书进行测定。

1.2.3.5 小鼠股骨指数、骨密度及骨钙含量的测定

去除小鼠双侧股骨周围的肌肉、软骨、结缔组织，测量股骨长度，称量股骨质量，计算股骨指数。骨密度采用双能 X 射线骨密度仪测定。骨钙含量采用火焰原子吸收法测定^[23]。

1.3 数据分析

采用 Origin 2021 绘图，SPSS 27 分析数据，试验结果用“平均值 ± 标准差”表示，显著水平 $P < 0.05$ ，极显著水平 $P < 0.01$ 。

2 结果与讨论

2.1 静态吸附解吸法最佳洗脱剂确定

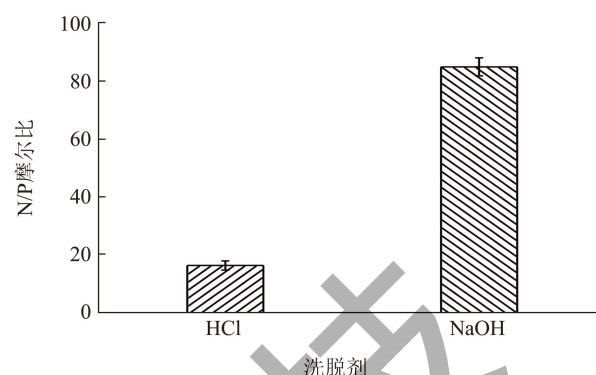


图 1 洗脱剂对 CPP N/P 的影响

Fig.1 Effect of the eluent on CPP N/P

CPP 的纯度与 N/P 摩尔比有关，较小的 N/P 值表示较高的纯度^[24]。为获得更低 N/P 摩尔比的 CPP，首先要确定离子交换树脂的洗脱剂。为了不引入更多杂质，试验选用 HCl 溶液和 NaOH 溶液作为洗脱剂^[25]。洗脱效果如图 1 所示，使用 NaOH 洗脱时，N/P 摩尔比值高达 85.19，洗脱效果不好，可能是由于吸附在树脂上的蛋白含量较多，而碱性条件下，多肽与离子树脂间有更强的静电作用，使 CPP 难以被洗脱，而用 0.2 mol/L HCl 作为洗脱剂时，N/P 摩尔比相对于 NaOH 洗脱时显著降低，有更多含磷蛋白被解吸下来，所以试验选择 HCl 作为洗脱剂。

2.2 动态吸附解吸法确定纯化工艺

2.2.1 上样量对纯化 CPP 的影响

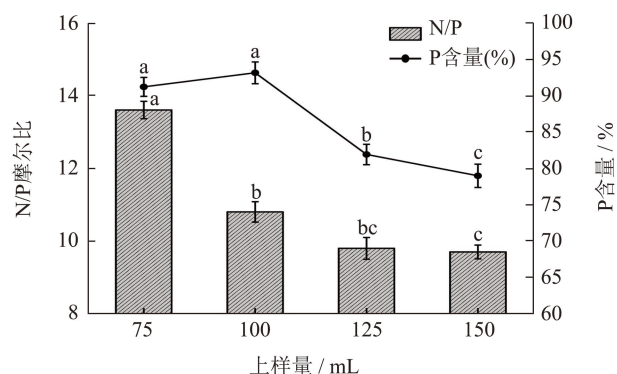


图 2 上样量对 CPP 纯化的影响

Fig.2 Effect of sample volume on the purification of CPP

注：图中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)，下同。

上样量对 CPP 的影响如图 2 所示，上样量为 75 mL 时，CPP 的 N/P 较高，为 13.6，随着上样量

的增加, P 的回收率逐渐降低, 但 N/P 逐渐降低, 可能是因为更多的酪蛋白非磷酸肽 (CNPP) 也相继竞争吸附到树脂上, 使 N 含量增加, 降低分离效果^[25], 随着上样质量浓度逐渐增加, N/P 逐渐平稳, 此时可能树脂已吸附饱和, 未被吸附的 CPP 随着 CNPP 一同流出, 导致 CPP 损失, 因此上样量选择为 100 mL, 既能减少 CPP 的损失又能获得纯度较高的 CPP。

2.2.2 上样流速对纯化CPP的影响

上样流速对纯化 CPP 的影响如图 3 所示, 随着上样流速提高, CPP 的 N/P 摩尔比先降低后升高。当流量达到 3 mL/min 时, P 的回收率达到最大为 94.35%, N/P 摩尔比最低为 8.1, CPP 有较好的纯度, 上样流速与分离效果密切相关, 流速慢时, 离子柱内会出现一定的反混现象, CNPP 也会竞争吸附到树脂上, 而流速过快, CPP 还未来得及与树脂结合, 就流出离子柱, 树脂吸附量和吸附性能均下降, 导致分离效果不理想。

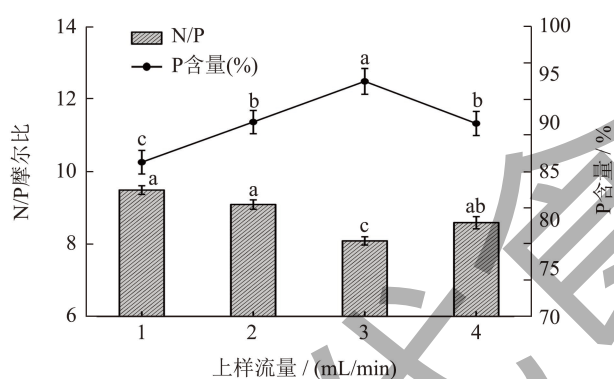


图 3 上样流速对 CPP 纯化的影响

Fig.3 Effect of loading flow rate on the purification of CPP

2.2.3 洗脱酸浓度对纯化CPP的影响

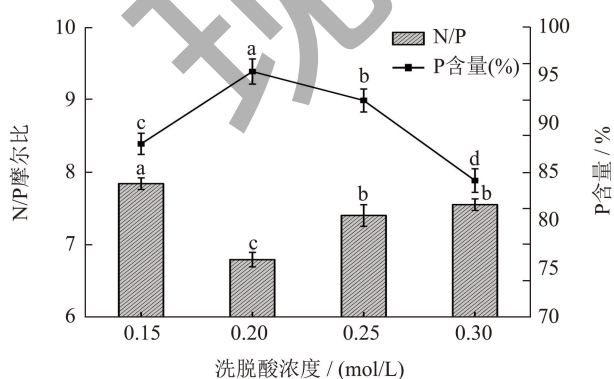


图 4 洗脱酸浓度对 CPP 纯化的影响

Fig.4 Effect of elution acid concentration on the purification of CPP

HCl 浓度对 CPP 分离纯化效果如图 4 所示, 随着酸浓度提高, P 含量先升高后下降, 这说明随着 HCl 浓度的提高对 CPP 解吸的能力先增大后减小。当浓度为 0.2 mol/L 时, 解吸效果最佳, P 的回收率达到 95.5%, 吸附与解吸平衡取决于样品溶液与离子交换树脂之间的静电相互作用力^[25]。当 HCl 浓度为 0.2 mol/L 时, P 含量达到最大值, 纯化后 CPP 的 N/P 摩尔比最低, 此时 CPP 与树脂间静电相互作用力较弱, 洗脱效果最好, 同时低浓度 HCl 洗脱引入的盐分量更少, 所以选择 0.2 mol/L HCl 溶液作为洗脱液。

2.2.4 阴离子树脂动态解吸曲线

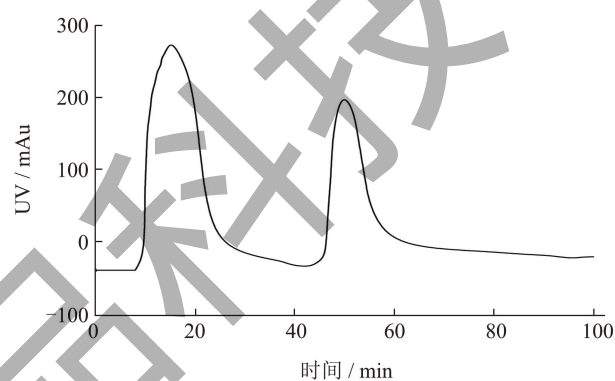


图 5 阴离子树脂动态解吸曲线

Fig.5 Dynamic desorption curve of anionic resin

图 5 为最优条件下的动态洗脱 CPP 色谱图, 洗脱剂为 0.2 mol/L HCl, 粗 CPP 溶液通过阴离子树脂, 由于 CPP 含有较多 PO_4^{3-} , 有较强电负性, 会竞争吸附在树脂上^[25], 故第一个峰是未被吸附的 CNPP, 没有含磷蛋白, 当第一峰结束, 用洗脱剂将吸附在树脂上的 CPP 洗脱下来, 形成第二个含有所需目标肽的酸洗峰。收集酸洗组分, 得到纯化的酪蛋白磷酸肽。

2.2.5 CPP 基本成分结果

钙的主要结合位点是谷氨酸的羧基和羰基^[26], 而 CPP 的活性中心是磷酸丝氨酸和谷氨酸残基簇 [-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-](Sp Sp Sp EE), 可以有效地与 Ca^{2+} 结合^[27,28], 因此谷氨酸、丝氨酸含量越高 CPP 结合 Ca^{2+} 能力越强。由表 2 可知, 经测定含有的 16 种氨基酸中, 谷氨酸含量最高, 其次为丙氨酸、亮氨酸、赖氨酸和丝氨酸, 其中含 7 种必需氨基酸, 占总测定氨基酸的 33.1%, 与姜春秀^[29]等测定的 7 种商业用 CPP 氨基酸含量相比, 均高于商业用 CPP, 说明本实验纯化的 CPP 中氨基酸含量较为丰富; N/P 摩尔比为 6.81 (见表 3) 显著低于商业用 CPP。

表 2 CPP氨基酸成分及含量

氨基酸种类	含量/(g/100 g)	氨基酸种类	含量/(g/100 g)
Asp	5.84	Pro	3.56
Glu	18.55	Tyr	4.84
Ser	6.01	Val	5.13
Gly	1.72	Met	1.62
His	2.55	Ile	2.24
Arg	2.91	Leu	8.80
Thr	3.48	Phe	4.16
Ala	9.63	Lys	7.67

表 3 CPP基本成分

指标	水分/%	灰分/%	N 含量/%	P 含量/%	N/P 摩尔比
含量	4.98 ± 0.11	4.80 ± 0.08	4.99 ± 0.07	1.62 ± 0.16	6.81

2.2.6 CPP阻止磷酸钙沉淀的效果

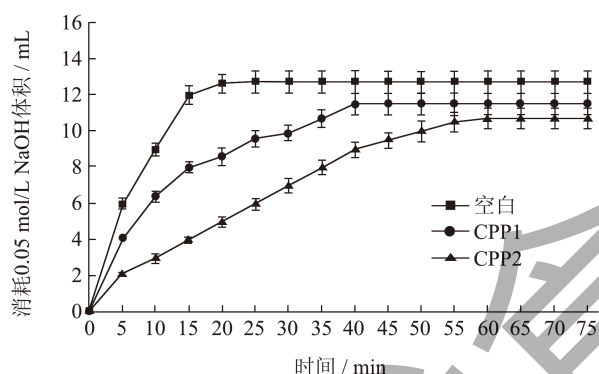


图 6 CPP 阻止磷酸钙沉淀的效果

Fig.6 The effect of CPP in preventing calcium phosphate precipitation

注: CPP1 为粗 CPP, CPP2 纯化后 CPP, 下同。

如图 6 所示, 空白组在 0~10 min 时, NaOH 消耗量迅速上升, 说明反应开始 10 min 内有大量沉淀生成; CPP1 的 N/P 较高, 添加使沉淀生成推迟至 15 min, CPP2 具有较低的 N/P, 沉淀大量生成的时间较空白组推迟了 26 min, 在 CPP1 阻钙沉淀的基础上又延迟了 20 min, 可见其有更好的阻钙沉淀活性。根据焦宇知等^[30]的结论, 磷酸基密度显著影响 CPP 结合钙能力, 钙结合能力与多肽链上负电荷密度成正比, 也有研究表明, 肽链较短时, 磷酸丝氨酸基团多的 CPP 会展现出更强的持钙能力^[31], 不同工艺制的 CPP 均符合该规律, 所以可以推测出本研究纯化过的 CPP 磷酸基密度较高。

2.2.7 CPP阻止亚铁离子沉淀的效果

如图 7 所示, 添加 CPP1 的试验组沉淀出现时间

约在 25 min 左右, CPP2 试验组沉淀出现时间在 35 min 后, 较 CPP1 推迟了 5~10 min, 该结果进一步表明了 N/P 摩尔比低的 CPP 功能性基团磷酸丝氨酸基密度越高, 其阻止二价金属离子形成沉淀的效果越好^[32]。

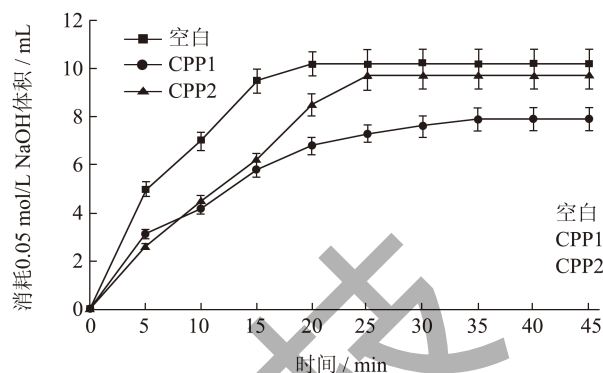


图 7 CPP 阻止亚铁离子沉淀的效果

Fig.7 Effect of CPP in preventing the precipitation of ferrous iron ions

2.3 CPP体内活性试验

2.3.1 CPP对小鼠体质量的影响

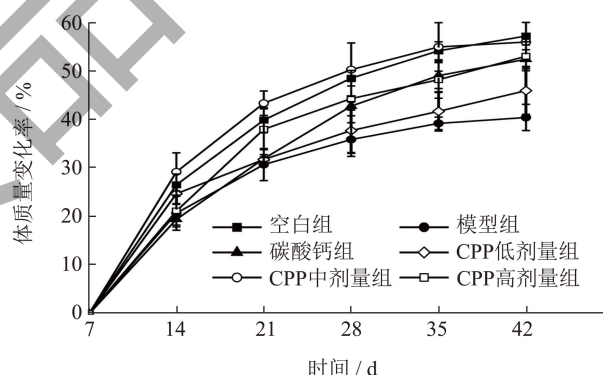


图 8 小鼠体质量变化率

Fig.8 Rate of body weight change in mice

在整个试验期间, 所有组别小鼠摄食排泄等行为均正常, 未发现腹泻及异常死亡现象, 自由摄食低钙饲料组别出现一定暴躁情绪, 出现打斗现象, 对小鼠体质量出现一定程度的影响。由图 8 可知随着饲养天数的增长, 小鼠体质量增长率逐渐降低, 最后趋于平缓, 这可能是由于小鼠最初处于发育较快的幼鼠期, 体质量增长较快, 成长后期体质量增长减缓。图 9 为小鼠体质量增长率, 经 42 d 灌胃结束后, 模型组小鼠体质量较之前增长 40.36%, 小鼠体质量在整个试验期间均为最低水平。碳酸钙组增长 52.32%, 低、中、高剂量组依次增长 45.86%、55.85% 和 52.93%, 说明低钙饲料对小鼠体质量有一定影响。

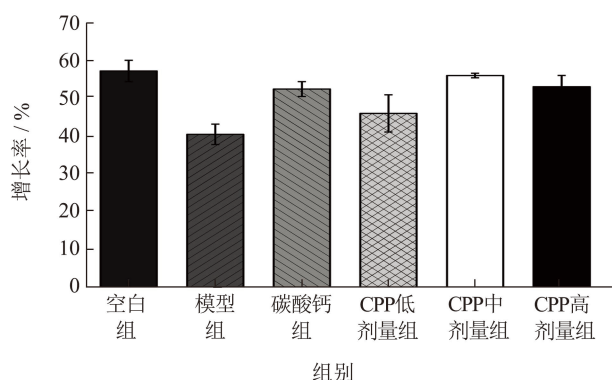


图9 小鼠体质量增长率

Fig.9 Body weight growth rate of mice

2.3.2 CPP对小鼠脏器指数的影响

通过脏器指数可以判断药物是否具有慢性毒性。若内脏病变肿胀，脏器指数会超过合理范围，说明药物具有慢性毒性^[33]。本试验经42 d喂养内脏指数如表4所示，所有小鼠内脏指数均在合理范围内，无显著差异 ($P>0.05$)，因此可以证明CPP确无慢性毒性，不会引起脏器病变肿大。

2.3.3 CPP对小鼠血清生化指标的影响

稳定的血钙、血磷含量是维持机体正常生命体征的必要条件。血清钙含量与肠道钙吸收、骨钙融出、降钙素等激素相关，有效补充钙可以维持血钙正常水平，抑制甲状旁腺激素水平增加，血钙水平降低则代表机体对钙的吸收较差，血液缓冲体系中磷酸盐是极其重要的组分，参与多种酶促反应，血清磷过高或过低会对骨骼系统造成损害^[34,35]。由图10可知，与空白组相比，模型组小鼠血钙浓度、血磷浓度都具有显著差异 ($P<0.05$)，说明低钙小鼠模型造模成功，其血钙、磷含量分别为2.13 mmol/L、2.18 mmol/L，CPP中剂量、高剂量组血钙含量与空

白组相比无显著差异 ($P>0.05$)，说明中、高剂量CPP可以有效避免因钙摄入不足而导致的机体钙失衡。

血清碱性磷酸酶 (ALP) 是一种含Zn的糖蛋白，主要由骨细胞释放，骨形成加强，成骨细胞会分泌较多ALP，一部分参与骨钙化，一部分进入血液，血液ALP的含量及活性与成骨细胞的活动成正比，所以ALP是反应骨代谢的重要指标^[36,37]。如图11所示，CPP低中高剂量组ALP含量分别为108.4、100.3、97.4 U/L，极显著低于模型组 ($P<0.01$)，与碳酸钙组ALP值相比，中、高剂量组含量显著降低 ($P<0.05$)，模型组ALP值极显著高于其余各组 ($P<0.01$)，说明小鼠ALP分泌量增大，小鼠骨代谢出现异常，成骨细胞活跃，这与黄志杰^[38]、朱必洋^[39]研究结果一致，当机体摄入钙不足时，骨细胞受甲状旁腺激素影响，成骨细胞表现异常活跃，ALP会出现代偿性增长，说明CPP的摄入使小鼠有较好的调节ALP的能力，高剂量的CPP更能有效抑制骨代谢，增强骨稳定。

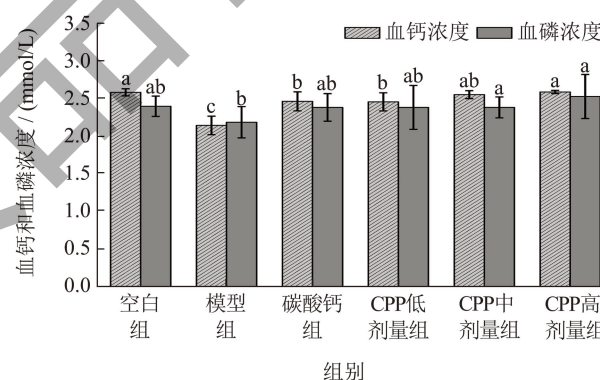


图10 CPP对小鼠血钙、血磷的影响

Fig.10 Effect of CPP on blood calcium and blood phosphorus in mice

表4 小鼠内脏指数

Table 4 Mouse visceral index

分组	内脏指数/%				
	心脏	肝脏	脾脏	肺	肾脏
空白组	0.303 ± 0.049 ^a	1.715 ± 0.153 ^a	0.104 ± 0.024 ^a	0.252 ± 0.029 ^a	0.660 ± 0.081 ^a
模型组	0.305 ± 0.058 ^a	1.640 ± 0.100 ^a	0.093 ± 0.012 ^a	0.264 ± 0.028 ^a	0.628 ± 0.054 ^a
碳酸钙组	0.314 ± 0.052 ^a	1.731 ± 0.219 ^a	0.093 ± 0.015 ^a	0.242 ± 0.025 ^a	0.639 ± 0.097 ^a
CPP低剂量	0.309 ± 0.070 ^a	1.715 ± 0.191 ^a	0.105 ± 0.028 ^a	0.259 ± 0.044 ^a	0.634 ± 0.056 ^a
CPP中剂量	0.306 ± 0.062 ^a	1.584 ± 0.225 ^a	0.089 ± 0.019 ^a	0.242 ± 0.036 ^a	0.666 ± 0.137 ^a
CPP高剂量	0.306 ± 0.053 ^a	1.518 ± 0.188 ^a	0.083 ± 0.018 ^a	0.229 ± 0.039 ^a	0.564 ± 0.070 ^a

注：表中上标字母不同表示同列差异显著 ($P<0.05$)，下表同。

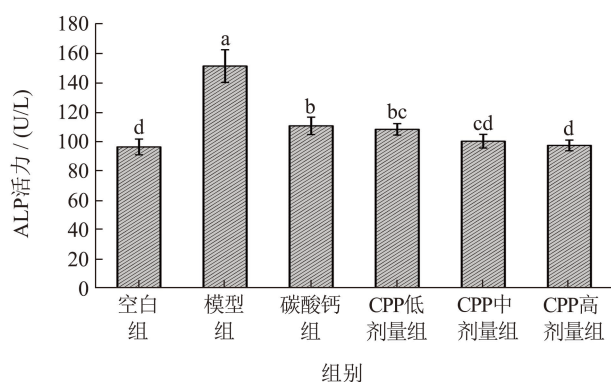


图 11 CPP 对小鼠 ALP 活力的影响

Fig.11 Effect of CPP on ALP activity in mice

2.3.4 CPP对小鼠骨指标的影响

2.3.4.1 小鼠股骨指数及长度

股骨能间接反应小鼠骨骼生长发育状态，通过对小鼠股骨指数、股骨长度等骨常规指标检测可以反应 CPP 对小鼠骨骼生长的促进作用。如表 5 所示，空白组、碳酸钙组、CPP 各剂量组股骨指数和长度均显著高于模型组 ($P < 0.05$)，说明 CPP 可有效促进钙吸收和小鼠骨骼生长。CPP 各剂量组与碳酸钙组的股骨长度无显著差异 ($P > 0.05$)，Chen 等^[40]研究表示，碳酸钙、罗非鱼鱼鳞蛋白水解物钙复合物和 CPP-Ca 复合物均能使股骨长度增加，但各组无显著差异，本研究结果与其基本一致。

表 5 小鼠股骨指标

Table 5 Metrics of femur in mice

组别	股骨长度 /mm	股骨质量 /mg	股骨指数 /(mg/g)
空白组	16.68 ± 0.25 ^a	108.07 ± 15.66 ^a	4.62 ± 0.43 ^b
模型组	16.03 ± 0.49 ^b	89.54 ± 8.37 ^b	4.21 ± 0.17 ^c
碳酸钙组	16.55 ± 0.33 ^a	104.67 ± 8.79 ^{ab}	4.63 ± 0.19 ^b
CPP 低剂量	16.56 ± 0.34 ^a	102.83 ± 16.64 ^{ab}	4.71 ± 0.42 ^{ab}
CPP 中剂量	16.56 ± 0.43 ^a	116.64 ± 18.22 ^a	4.90 ± 0.26 ^{ab}
CPP 高剂量	16.58 ± 0.50 ^a	114.63 ± 14.75 ^a	4.99 ± 0.24 ^a

2.3.4.2 小鼠骨密度与骨钙含量

骨密度又称骨矿物质密度，与骨骼强度和内部结构密切相关，同时钙摄入不足会导致骨钙流失。本试验对小鼠骨密度与骨钙含量测定结果如图 12，与模型组和碳酸钙组相比，CPP 中、高剂量组小鼠的骨密度和骨钙含量均显著提高 ($P < 0.05$)，CPP 低剂量组骨密度差异不显著 ($P > 0.05$)，模型组小鼠长期食用低钙饲料，钙营养严重缺乏^[41]，中、高剂量 CPP 组小鼠骨密度和骨钙含量显著高于碳酸钙

组，说明中、高剂量 CPP 可以促进小鼠对钙的吸收利用，有利于钙在骨骼中沉积。

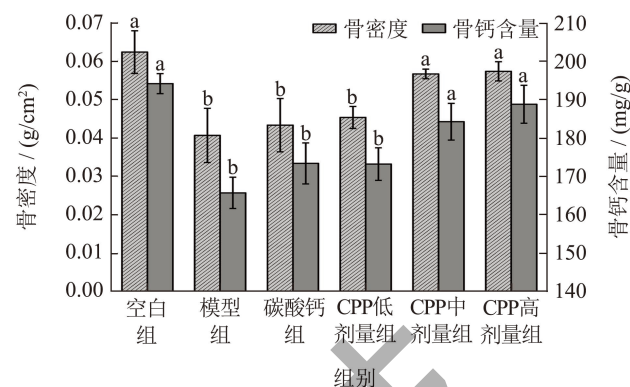


图 12 CPP 对小鼠骨密度和骨钙含量的影响

Fig.12 Effect of CPP on bone mineral density and bone calcium content in mice

3 结论

本实验以牦牛乳酪蛋白磷酸肽为研究对象，对其进行纯化工艺优化，并在体外和体内探究其促进钙吸收的作用。纯化工艺优化结果显示，用 0.2 mol/L 稀盐酸作为洗脱液，上样流速为 3 mL/min，上样量为 100 mL 的条件下，洗脱制得的 CPP 的 N/P 比较低，其中谷氨酸和丝氨酸的含量也较高。促钙吸收作用的研究结果显示，纯化后的 CPP 拥有良好的体外持钙能力，且能够螯合金属离子。在体内试验中，CPP 中高剂量组可以明显地提高小鼠的钙吸收能力，并对骨骼的生长起到一定的促进作用。因此牦牛乳 CPP 可作为较好的促钙吸收剂。以上结果可为牦牛乳 CPP 的开发提供理论依据。

参考文献

- [1] 王泽,张岩,陈炼红.Edam牦牛干酪成熟过程中品质变化及蛋白质降解[J].食品科学,2023,44(2):116-124.
- [2] 魏黎阳,张九凯,陈颖.不同哺乳动物乳的营养成分及生物活性研究进展[J].食品科学,2023,44(5):365-374.
- [3] 李亚茹,郝力壮,牛建章,等.牦牛乳与其他哺乳动物乳功能性营养成分的比较分析[J].食品科学,2016,37(7):249-253.
- [4] 代安娜,杨具田,丁波,等.牦牛乳组分及功能特性研究进展[J].动物营养学报,2022,34(6):3443-3453.
- [5] LI H, MA Y, DONG A, et al. Composition protéique du lait de yak [J]. Dairy Science & Technology, 2010, 90: 111-117.
- [6] 吴登宇,韦体,马忠仁,等.牦牛乳酪蛋白抗氧化肽对 HEK293 细胞氧化应激损伤的保护作用[J].食品科学, 2023,44(23):142-150.

- [7] 宋雪梅,梁琪,宋国顺,等.牦牛乳硬质干酪体外消化前后ACE抑制肽分析[J].食品与发酵工业,2020,46(15):52-59.
- [8] PEI J, JIANG H, LI X, et al. Antimicrobial peptides sourced from post-butter processing waste yak milk protein hydrolysates [J]. AMB Express, 2017, 7: 1-6.
- [9] ZHU L, SHI L, WANG Q E, et al. Fabrication of a ferritin-casein phosphopeptide-calcium shell-core composite as a novel calcium delivery strategy [J]. Food & Function, 2021, 12(22): 11378-11386.
- [10] DELSHADIAN Z, MORTAZAVIAN A M, TABARZAD M, et al. Optimisation of experimental conditions for binding of divalent iron to bioactive casein phosphopeptides [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2018, 53(3): 784-793.
- [11] SMIALOWSKA A, MATIA-M L, CARR A J. Assessing the iron chelation capacity of goat casein digest isolates [J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(4): 2553-2563.
- [12] 徐曼,何东平,卫娜,等.酪蛋白磷酸肽持钙能力的研究[J].现代食品科技,2012,28(3):278-281.
- [13] 刘果.酪蛋白磷酸肽制备、鉴定、促钙吸收活性及机理研究[D].广州:华南农业大学,2018.
- [14] ZHANG H, NAKAMURA S, KITTS D D. Antioxidant properties of casein phosphopeptides (CPP) and maillard-type conjugated products [J]. Antioxidants, 2020, 9(8): 648.
- [15] GB 31617-2014,食品营养强化剂 酪蛋白磷酸肽[S].
- [16] 解冠华.酶水解法制备水牛乳酪蛋白磷酸肽[D].南昌:南昌大学,2007.
- [17] 朱樱.茶黄素的分离纯化及抗氧化与抑制 α -葡萄糖苷酶活性研究[D].芜湖:安徽工程大学,2022:20.
- [18] 郑越萍.酵母中谷胱甘肽的分离纯化及其应用研究[D].大连:大连工业大学,2012.
- [19] GB 5009.4-2016,食品中灰分的测定[S].
- [20] GB 5009.5-2016,食品中蛋白质的测定[S].
- [21] GB 5009.87-2016,食品中磷的测定[S].
- [22] 何晨,王彦超,常耀光,等.功能性蛋黄肽的制备及体外活性研究[J].食品工业科技,2014,35(19):53-56.
- [23] GB 5009.92-2016,食品中钙的测定[S].
- [24] LIU G, GUO B, SUN S, et al. Promoting the Calcium-Uptake bioactivity of casein phosphopeptides *in vitro* and *in vivo* [J]. Frontiers in Nutrition, 2021, 8: 743791.
- [25] 徐桂敏,杨瑞金,张文斌,等.一种连续分离纯化酪蛋白磷酸肽的新工艺[J].食品科学,2011,32(8):24-28.
- [26] HUANG S L, ZHAO L N, CAI X, et al. Purification and characterisation of a glutamic acid-containing peptide with calcium-binding capacity from whey protein hydrolysate [J]. Journal of Dairy Research, 2015, 82(1): 29-35.
- [27] LI S, QIANG S, WANG J, et al. Structure, stability, and mechanism of dextran-CPP-Ca²⁺ conjugates: A novel high-efficiency calcium ion delivery system [J]. Food Chemistry, 2023, 408: 135190.
- [28] SUN N, WANG Y, BAO Z, et al. Calcium binding to herring egg phosphopeptides: Binding characteristics, conformational structure and intermolecular forces [J]. Food chemistry, 2020, 310: 125867.
- [29] 姜春秀,全威,陈洁,等.不同酪蛋白磷酸肽产品理化性质与持钙能力的相关性分析[J].食品工业科技,2021,42(18):292-299.
- [30] 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,2006,1:27-30.
- [31] SUN N, WU H, DU M, et al. Food protein-derived calcium chelating peptides: A review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 58: 140-148.
- [32] 郭宝颜,刘果,梁曹雯,等.两种酪蛋白磷酸肽混合物的钙结合能力及物化性质比较[J].现代食品科技,2020,36(9):96-100,125.
- [33] 张文,覃志彪,成静,等.辣蓼黄酮提取物的急性毒性和亚慢性毒性研究[J].中国畜牧兽医,2022,49(4):1532-1544.
- [34] SOETAN K O, OLAIYA C O, OYEWOLE O E. The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review [J]. African Journal of Food Science, 2010, 4(5): 200-222.
- [35] KILAV-L R, HASSAN A, NECHAMA M, et al. Post-transcriptional mechanisms regulating parathyroid hormone gene expression in secondary hyperparathyroidism [J]. The FEBS Journal, 2020, 287(14): 2903-2913.
- [36] ZENG Z, PENG C Z, LIU J B, et al. Efficacy of ultrasound-guided radiofrequency ablation of parathyroid hyperplasia: single session vs. two-session for effect on hypocalcemia [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 6206.
- [37] ZHOU J, ZHANG J, XUE B, et al. Effects of pre-mating calcium and phosphorus supplementation on reproduction efficiency of grazing yak heifers [J]. Animals, 2021, 11(2): 554.
- [38] 黄志杰.鳄鱼肉肽螯合钙的制备与功效研究[D].厦门:厦门大学,2020.
- [39] 朱必洋.基于酪蛋白磷酸肽和壳寡糖的三种新型钙递送体系组装、评价及体内活性研究[D].武汉:华中农业大学,2020.
- [40] CHEN D, MU X, HUANG H, et al. Isolation of a calcium-binding peptide from tilapia scale protein hydrolysate and its calcium bioavailability in rats [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 6: 575-584.
- [41] 黄海,李八方,刘尊英,等.鱼卵肽钙复合物对大鼠体内促钙吸收作用的研究[J].食品工业科技,2014,35(3):331-335.