文章编号:1009-038X(2004)01-0089-05

酪蛋白磷酸肽新工艺及其体外功能性质

焦宇知, 王 璋, 许时婴
(江南大学 食品学院,江苏 无锡 214036)

摘 要: 用 Alcalase 水解酪蛋白,用 TNBS 法监测酪蛋白的水解度(DH),运用纳滤技术改善产品质量;同时还研究了不同 r_N/r_P(摩尔比)的 CPP(酪蛋白磷酸肽)结合钙离子和亚铁离子的能力. 结果表明,用 Alcalase 酶可以使酪蛋白的水解度(DH)达到 16%~20%,TNBS 法可以明显减少碱的引入,从而降低 CPP 产品的灰分含量. 截留相对分子质量为 150 的纳滤膜可以适当的降低 CPP 产品的 r_N/r_P,改善产品质量,而且能达到 80%的总氮回收率;在 DH 为 20%左右,r_P 基本上没有损失. 该工艺适合于工业化生产较高 r_N/r_P 的 CPP 产品. r_N/r_P 较低的 CPP 结合钙的能力好于 r_N/r_P 较高的 CPP 产品;CPP 也可以抑制亚铁离子的沉淀.

关键词: 酪蛋白磷酸肽;碱性蛋白酶;TNBS 法;纳滤;结合钙
中图分类号:Q 556.9 **文献标识码**: A

CPP Produced by a Novel Processing Technology and its Functional Properties

JIAO Yu-zhi, WANG Zhang, XU Shi-ying
(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Alcalase was employed in hydrolyzing the casein and TNBS method was used to detect the degree of hydrolysis (DH) during the hydrolysis of the casein. Nanofiltration was also used in the procedure to produce CPP with better quality by removing short peptides and free amino acids in the casein hydrolysates. Calcium and iron(Ⅱ) binding ability of CPP was also studied in this paper. The results showed that the DH of casein reached 16%~20% by using the Alcalase compared with 12% DH by trypsin. The method of TNBS decreased the addition of base to the solution thus the content of ash could be reduced. The nanofiltration membrane with 150 Dalton of molecular weight interception reduced the molar ratio of N to P (r_N/r_P), improved the quality of the product, and the nitrogen recovery rate of 80% could be reached. P could be completely recovered at DH 20%. Hence, the technology is suitable to produce CPP products with high r_N/r_P (molar ratio) in a large scale. CPP with lower r_N/r_P (molar ratio) was found to be better than CPP with higher r_N/r_P (molar ratio) in binding calcium and inhibiting precipitation of calcium phosphate. CPP was also found to be able to inhibit the precipitation of Iron(Ⅱ).

Key words: CPP; Alcalase; TNBS; Nanofiltration; calcium binding

收稿日期:2003-04-22; **修回日期**:2003-05-12.

作者简介: 焦宇知(1979-),男,安徽桐城人,食品科学与工程硕士研究生.

万方数据

酪蛋白磷酸肽(CPP)是以牛奶酪蛋白为原料，经过蛋白酶水解，再分离纯化后得到的含有磷酸丝氨酰基的肽. CPP 的核心部位由 3 个磷酸丝氨酸残基组成一个-Ser(P)-残基簇，后面紧接着 2 个-Glu-残基. CPP 被称为钙促进因子[1~2]，能通过增加无机铁的溶解性促进铁在肠道中的吸收.

工业制备 CPP 的方法有钙-乙醇沉淀法、膜分离法和离子交换法[3]. 作者采用 Alcalase 水解酪蛋白并运用纳滤技术得到 CPP 产品，并将此工艺与钙-乙醇沉淀工艺进行比较；还研究了各级 CPP 的结合钙和亚铁离子的能力，从而评价该新工艺的特点和可行性.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

酪蛋白：食品级，绿宝石乳业集团公司提供；Alcalase FG2.4 L：Novo 公司产品(A/S=2 800)；纳滤膜 NF270-2540：南京化工大学膜科所产品；pXS-215 型离子活度计：上海雷磁厂生产；钙离子选择电极：上海雷磁厂生产.

1.2 工艺流程

膜分离法生产 CPP 的工艺路线：

酪蛋白 —(Alcalase 水解 / TNBS 法检测水解度)→ 酪蛋白水解液 —(纳滤)→ —(喷雾干燥)→ CPP 产品

乙醇钙沉淀法工艺路线：

酪蛋白 —(胰酶水解 / pH-stat 法检测水解度)→ 酪蛋白水解液 —(乙醇钙沉淀)→ —(干燥)→ CPP 产品

1.3 分析与测定方法

1.3.1 总氮的测定 半微量凯氏定氮法[4].

1.3.2 灰分的测定 灼烧法[4].

1.3.3 总磷的测定 Morrison 快速微量定磷法[5].

1.3.4 水分质量分数的测定 干燥法.

1.3.5 CPP 质量分数测定 乙醇钡沉淀法(荷兰公司提供).

1.3.6 水解度的测定 TNBS 法[6].

1.3.7 CPP 产品结合钙能力的测定 利用 pXS-215 型离子活度计和钙离子选择电极测定游离钙的质量浓度. 结合钙质量浓度=总钙质量浓度-游离钙质量浓度[7].

1.3.8 CPP 阻止亚铁离子沉淀效果的定性测量 根据文献[7]中测定 CPP 阻止磷酸钙沉淀效果的方法并作改进. 在反应器中加入适量 0.1 mol/L 的 NaH_2PO_4 和 CPP，使得两者在 500 mL 反应体系中浓度分别为 8 mmol/L 和质量浓度 0，400，1 200 mg/L. 溶液保温到 25 ℃ 后加入 0.1 mol/L 的 $FeSO_4$ 溶液，使得 Fe^{2+} 浓度为 8 mmol/L 且反应体系中 $r(Fe)：r(P)=1：1$. 其中，P 指由 NaH_2PO_4 所提供的以不同离解状态存在的磷酸根中的磷. 此时立即用 0.1 mol/L 的 NaOH 将反应体系 pH 调到 7.2，并不断滴加 0.1 mol/L 的 NaOH 使得体系的 pH 保持在 7.2 时. 从调节 pH 即开始计时，pH 调到 7.2 约需 2 min，从 2 min 开始记录 0.1 mol/L 的 NaOH 的消耗量. 以时间为横坐标，0.1 mol/L 的 NaOH 的消耗量为纵坐标作图[7].

2 结果与讨论

2.1 Alcalase 取代胰酶水解酪蛋白

图 1 是酪蛋白水解度进程曲线，用 TNBS 法监测水解度. 从图上可以看出，Alcalase 表现出了较强的水解能力，当水解时间接近 5 h 时水解度已达到 16%.

与胰蛋白酶相比，Alcalase 有以下 2 个优点：

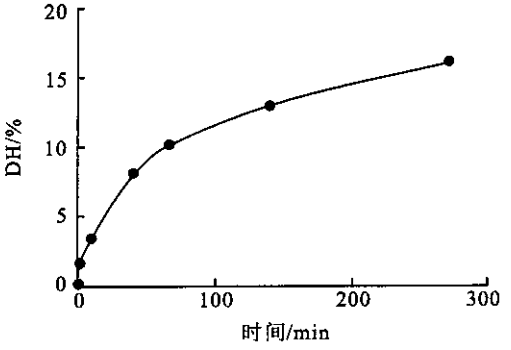


图 1 酪蛋白在 Alcalase 的作用下水解度曲线

Fig. 1 DH curve of casein hydrolyzed by Alcalase

注：水解温度：60 ℃；水解起始 pH：8.5；E/S=36 U/kg；酪蛋白质量浓度：20 g/dL

1) 在各自的最佳反应条件下，Alcalase 对酪蛋白的水解能力要比胰蛋白酶强，胰蛋白酶水解酪蛋白的水解度一般只能达到 12%，而 Alcalase 水解度则可以达到 16%～20%.

2) Alcalase 较胰蛋白酶便宜.

2.2 TNBS 法代替 pH-stat 法监测酪蛋白水解过程

与 pH-stat 法相比，TNBS 法监测水解度有以下 3 个优点：

1) pH-stat 法为了控制 pH 值到酶的最佳反应 pH 值 8.5，在整个水解过程中加入碱；而用 TNBS

万方数据

法监测酪蛋白水解度则仅在水解前加碱调节体系的 pH 值到酶的最佳反应 pH 值,这样 TNBS 法就节省了碱的用量.

2) TNBS 法测得的水解度要比 pH-stat 精确,见图 2.

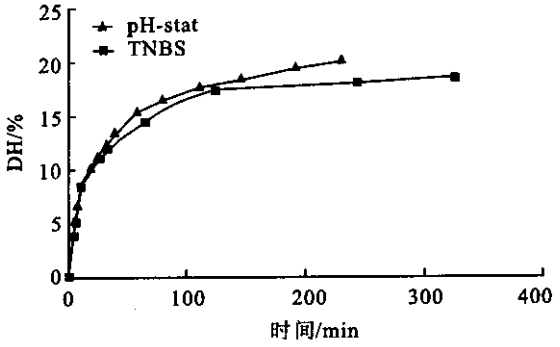


图 2　pH-stat 法和 TNBS 法测定酪蛋白水解度比较

Fig. 2　The comparison of DH of casein determined by pH-stat method and TNBS method

由图 2 可以看出,用 TNBS 法测得的水解度比 pH-stat 法测得的水解度小一些,原因可能是 pH-stat 法所使用的碱一部分用于和酪蛋白溶液中其他的阳离子结合生成溶解性较差的碱而消耗了碱的用量.

3) TNBS 法可以明显的降低 CPP 产品中灰分的质量分数,见表 1. 由表 1 可以看出:

(1) 2 种方法所得到产品的灰分质量分数有着明显的差别,TNBS 法监测酪蛋白水解度所得产品的灰分质量分数是 pH-stat 法所得到的产品的一半. CPP 作为一种功能性食品,灰分的质量分数不能太高,而用 TNBS 法得到的 CPP 的灰分质量分数和荷兰公司产品的灰分质量分数相当(荷兰公司的 CPP 产品的灰分质量分数为 5.7%).

(2)两者除灰分质量分数不同外,r_N/r_P 和 N 的得率都差不多,这表明 TNBS 法完全可以替代 pH-stat 法.

表 1　不同水解度监测方法所得 CPP 产品成分比较(pH-stat 法 和 TNBS 法)

Tab. 1　The comparison of the CPP components produced by different DH control methods(pH-stat method and TNBS method)

TNBS 法	纳滤前液体	纳滤后液体	纳滤前固体产品	纳滤后固体产品	pH-stat 法	纳滤前样品	纳滤后样品	喷雾干燥样品
r_N/r_P	32.6	25.1	32.7	24.9	r_N/r_P	32.2	22.7	22.7
N 的得率/%	95.5	79.3	79.3	79.3	N 的得率/%	100.0	82.8	82.8
P 的得率/%	100.0	100.0	100.0	100.0	P 的得率/%	100.0	100.0	100.0
H_2O 质量分数/%			6.1	4.4	H_2O 质量分数/%			2.3
灰分质量分数/%			5.9	5.9	灰分质量分数/%			10.3
CPP 质量分数/%			15.4		CPP 质量分数/%			22.1

注:r_N/r_P:产品中磷酸丝氨酸残基的密度,r_N/r_P 愈低,磷酸丝氨酸残基密度越高;CPP 质量分数:CPP 样品溶液经等电点处理,使部分酪蛋白水解物沉淀,后离心得到上清液,再经乙醇钡沉淀之后得到的沉淀干重占 CPP 样品干重的百分比.

2.3　纳滤技术取代乙醇钙沉淀法改善产品质量

纳滤膜用于本工艺的目的主要是滤去一些短肽和游离氨基酸,适当的降低 r_N/r_P,代替乙醇钙沉淀法改善产品质量. 对该项技术的要求是 N 的回收率要高,P 最好不要损失.

2.3.1　透过液中短肽及氨基酸的流走情况　收集纳滤透过液体,浓缩干燥后测定其中的主要成分,结果见表 2.

由表 2 可以看出,在纳滤过程中,P 基本上没有损失,透过液中存在游离氨基酸和短肽.

2.3.2　纳滤改善产品的质量　由表 1 可以看出,纳滤后得到 CPP 产品的 r_N/r_P 有了一定的降低,产品质量有了一定改善. 虽然 r_N/r_P 较乙醇钙沉淀法得到的 CPP 产品的 r_N/r_P 要高,但是纳滤过程能耗低、回收率高,不会因为引入钙离子而增加灰分含量,适合于工业生产. 乙醇钙法能耗大,引入钙,而且乙醇的回收也较困难. 因此用纳滤取代乙醇钙沉淀法改善 CPP 产品质量的工艺很有前途.

表 2　透过液经过冷冻干燥后成分分析

Tab. 2　Analysis of components in permeated solution after freezing dry

成 分	质量分数/%
P	0.01
游离氨基 N	2.23
蛋白质	36.30

万方数据

2.4 CPP 样品体外功能实验

2.4.1 不同 r_N/r_P 的 CPP 样品成分分析 用不同的生产工艺制得各级 CPP 产品，其主要成分分析见表 3.

表 3 不同 r_N/r_P 的 CPP 成分分析

Tab. 3 Analysis of components in CPP with different r_N/r_P (molar ratio)

样品号	CPP1	CPP2	CPP3	CPP4
r_N/r_P	32.4	24.57	11.47	10.25
CPP 质量分数/%	15.40	21.04	43.30	44.00
H_2O 质量分数/%	6.07	5.85	3.26	3.17
灰分质量分数/%	5.91	10.80	15.70	16.91
Ca^{2+} 质量分数/%	1.59	1.65		

CPP1 是用 Alcalase 水解酪蛋白(TNBS 法监测水解度)后的酪蛋白水解液直接喷雾干燥所得到的产品；CPP2 是用 Alcalase 水解酪蛋白(pH-stat 法检测水解度)后的酪蛋白水解液经过纳滤之后得到的喷雾干燥产品；CPP3，CPP4 是用 Alcalase 水解酪蛋白(pH-stat 法检测水解度)后的酪蛋白水解液经过乙醇钙沉淀得到的真空干燥产品.

由表 3 可以看出，各级 CPP 产品的 CPP 质量分数随着 r_N/r_P 的降低而增加；CPP1 的灰分质量分数最低，CPP1，CPP2 中基本上没有钙，由乙醇钙沉淀法得到的 CPP 产品灰分质量分数很高，钙的质量分数也很高.

2.4.2 不同 CPP 产品结合钙的能力与产品 r_N/r_P 之间的关系 用 pxs-21 型离子活度计和钙离子选择电极测定不同 r_N/r_P 的 CPP 在不同温度、pH 条件下的游离钙、总钙，分析结果见表 4.

CPP3，CPP4 的总钙质量浓度与 CPP1，CPP2 的不同是因为 CPP3，CPP4 产品中本身带有一定的钙. 测定体系的体积均为 50 mL，加入各级 CPP 的质量浓度均为 4 mg/mL.

由表 4 可以看出，在相同的温度和 pH 条件下，各 CPP 样品的结合钙的量随着 r_N/r_P 的降低而增大，这说明磷酸基的密度是 CPP 样品结合钙能力的关键指标之一. 磷酸基的密度越高，肽链上负电荷的密度越高，结合钙的能力就越强. 对于每一种 CPP 产品，在相同的的 pH 条件下，结合钙的能力随着温度的升高而降低，这可能是因为随着温度升高，CPP 分子与钙的结合力减小，因此结合钙的含量降低. 在相同的温度下，每一种 CPP 产品的结合钙的量都随着 pH 值的升高而增大，这可能是因为随着 pH 的升高，CPP 分子中所带的负电荷增多，因此结合钙离子的能力就越强，CPP 结合钙的量也随之增加.

表 4 不同 CPP 产品结合钙能力比较

Tab. 4 The comparison of different CPP products on calcium binding ability

样品	r_N/r_P	ρ(总钙)/(mg/L)	ρ(结合钙)/(mg/L)			
			pH 7.0		pH 7.4	
			35 ℃	25 ℃	35 ℃	25 ℃
CPP1	32.4	445.1	200.0	237.1	253.3	307.1
CPP2	24.59	445.1	214.6	281.1	302.4	325.7
CPP3	11.47	508.7	339.3	341.7	361.3	385.2
CPP4	10.25	511.1	341.7	347.1	363.5	389.0

2.4.3 CPP 阻止亚铁离子沉淀的效果 通过 CPP 延缓 Fe^{2+} 测定的时间来反映 CPP 结合 Fe^{2+} 的效果见图 3.

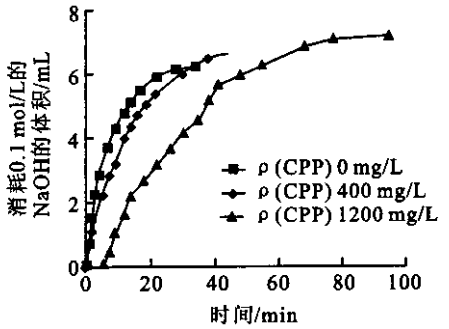


图 1 CPP 阻止亚铁离子测定效果

Fig. 1 Ability of CPP1 on inhibiting Iron(Ⅱ)

注：25 ℃，$r(Fe^{2+}):r(P)=1:1$ 时 CPP1 阻止亚铁离子沉淀效果

由图 3 可以看出，1 200 mg/L 的 CPP1 延缓亚铁离子沉淀的时间达到 80 min 以上. 据报道，钙离子是 CPP 结合亚铁离子的竞争抑制剂，对于缺铁的人来说，补钙会加剧缺铁的程度[9].

3 结 论

1) 用 Alcalase 可以使酪蛋白的 DH 达到 16%～20%；TNBS 法可以大幅度降低 CPP 产品中的灰分含量；截留相对分子质量为 150 的纳滤膜可以适当的降低 r_N/r_P，改善产品质量，N 的回收率能达到 80%，P 没有损失.

2)由于省去乙醇钙沉淀步骤，而纳滤本身所需压力小、纳滤温度低、能耗小，因此纳滤膜分离法可应用于工业化规模生产 CPP.

膜分离法生产出来的 CPP 的 r_N/r_P 较高. 据报道，并非 r_N/r_P 越低越好，磷酸丝氨酸残基以外的氨基酸残基对 CPP 的功能性质也起着一定的作

万方数据

用[10].因此,没有必要生产 r_N/r_P 太低的 CPP. 作者所在的实验室研究得出的工艺就比较适合于大规模、r_N/r_P 较高的 CPP 产品的经济生产.

3) r_N/r_P 较低的 CPP 产品结合钙的能力好于 r_N/r_P 较高的 CPP 产品. CPP 也可以抑制亚铁离子的沉淀.

参考文献:

[1] Park O, Swaisgood H E, Allen J C. Calcium binding of phosphopeptides derived from hydrolysis of αs-casein or β-casein using immobilized trypsin[J]. **Journal of Dairy Science**, 1998, 81:2850－2857.

[2] Meisel H, Oliman C. Estimation of calcium-binding constants of casein phosphopeptides by capillary zone electrophoresis [J]. **Analytica Chimica Acta**, 1998, 372: 291－297.

[3] 汤亚杰,吴思方. 酪蛋白磷酸肽的研究进展[J]. 食品科学,1998,19(5):3－6.

[4] 黄伟坤. 食品检验与分析[M]. 北京:轻工业出版社, 1989.

[5] Morrison W R. A fast and reliable method for the microdetermination of phosphorus in biological materials[J]. **Analytical biochemistry**, 1964,7:218－224.

[6] Jens Adler-Nissen. Determination of the degree of hydrolysis of the food protein in hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid[J]. **Journal of agriculture and food chemistry**,1979,27(6):1258－1262.

[7] 王瑛瑶,胡俊刚,王璋,等. 酪蛋白磷酸肽的体外功能试验[J]. 无锡轻工大学学报,2001,3:243－247.

[8] 赵利,王璋,许时婴. Alcalase 在酪蛋白磷酸肽生产中的应用研究[J]. 中国奶牛, 2002,5:15－18.

[9] 牟光庆, 鹿保鑫, 王新,等. 酪蛋白磷酸肽(CPP)对铁吸收影响的研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2001,13(1):70－73.

[10] 冯凤琴,许时婴,王璋. 酪蛋白磷酸肽的分子量及持钙功能的分析[J]. 食品与发酵工业,1997,23 (2):18－21.

(责任编辑:杨 萌)

(上接第 88 页)

参考文献:

[1] 赵谋明,林伟锋,胡坤,等. 多糖对大豆蛋白在水相介质中乳化特性的影响研究[J]. 食品工业科技,2002,23(6):31－34.

[2] Xie Y R, Hettiarachchy N S. Xanthan gum effects on solubility and emulsification properties of soy protein isolate[J]. **Journal of Food Science**, 1997, 62(6):1101－1104.

[3] 于金龙,孙远明,乐学义. 魔芋胶对大豆分离蛋白乳化特性的影响研究[J]. 中国粮油学报,2002,17(1):46－49.

[4] Girard M, Turgeon S I, Paquin P. Emulsifying properties of whey protein-carboxymethylcellulose Complexes[J]. **Food Engineering and Physical Properties**, 2002,87(1):113－119.

[5] Garti N, Slavin Y, Aserin A. Portulaca oleracea gum and casein interactions and emulsion stability[J]. **Food Hydrocolloids**, 1999,13:127－138.

[6] Pearce K N, Kinsella J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique[J]. **J Agric Food Chem**, 1978, 26(3):716－723.

[7] Hirotsuka M, Taniguchi H, Narita H, *et al*. Functionality and digestibility of a highly phosphorylated soybean protein [J]. **Agric Biol Chem**, 1984, 48(1):93－100.

[8] 温天舜,周大强,刘一勋. 随机数据分析与处理[M]. 开封:河南大学出版社,1993. 263－269.

[9] 钟 芳,麻建国,王 璋,等. 蛋白质的糖基化改性研究进展[J]. 食品科技, 2000,(5):12－15.

[10] 孙哲浩,赵谋明,彭志英. 蛋白质与多糖类交互作用对食品乳状液稳定性的影响[J]. 食品与发酵工业,2000,26(2):61－64.

(责任编辑:朱 明)

万方数据