

文章编号: 1009-038X(2001)02-0113-04

离子交换法制备酪蛋白磷酸肽

胡俊刚¹, 王璋¹, 许时婴¹, 谢良¹, 杜东平²

(1. 无锡轻工大学食品学院, 江苏无锡 214036; 2. 江苏梁丰食品集团公司, 江苏张家港 215600)

摘要: 分别用阴离子树脂和阳离子树脂对酪蛋白磷酸肽(Casein Phosphopeptide, 简称 CPP)初级品 N/P (摩尔比 r 为 7.52) 进行纯化。采用阴离子树脂纯化 CPP 的回收率为: P 98.71%; N 82.78%。高纯度 CPP 产品的 r (N/P) 为 5.44。对阳离子树脂纯化 CPP 做了初步探讨, 研究了不同 pH 对纯化效果的影响。在 pH 5.0 的最优条件下, 回收率 P 为 81.85%, N 为 53.80%, r (N/P) 为 4.67。与阴离子树脂纯化 CPP 的过程相比, 用阳离子树脂纯化 CPP 时, 树脂在使用前无需转型处理, 洗脱条件简单, 从而大大地缩短了操作时间, 并且提高了产品的浓度。

关键词: 酪蛋白磷酸肽(CPP); N/P 摩尔比(r); 离子交换树脂; 回收率

中图分类号: Q 516

文献标识码: A

Preparation of Casein Phosphopeptide by Ion-Exchange Resin Chromatography

HU Jun-gang¹, WANG Zhang¹, XU Shi-ying¹, XIE Liang¹, DU Dong-ping²

(1. School of Food Science and Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China; 2. Liangfeng Food Group CO., Zhangjiagang 215600, China)

Abstract: Primary grade casein phosphopeptide (CPP) with a N/P molar ratio of 7.52 was purified by using an ion-exchange resin and cation-exchange resin respectively. The recovery of CPP by using an ion-exchange resin was 98.71% for P and 82.78% for N and the molar ratio of N to P for the purified product was 5.44. The effect of pH on purification using cation-exchange resin was investigated. The results showed that with the optimal pH 5.0, the recovery of CPP was 81.85% for P and 53.80% for N and the molar ratio of N to P was 4.67. In comparison to using anion-exchange resin, the procedure of transferring type was not necessary before sample application and the eluting condition was also simpler by using cation-exchange resin. A greatly shortened operation time and concentrated product could be resulted from the use of cation-exchange resin.

Key words: casein phosphopeptide(CPP); N/P(molar ratio); ion-exchange; recovery

钙是骨骼和牙齿的主要成分,也是细胞和血液中主要的生理活性物质,是现代医学所确定的人类生命最重要的元素之一。而当今世界,缺钙已成一

大营养问题。酪蛋白磷酸肽(CPP)是以牛奶酪蛋白为原料,经单一酶或复合酶系水解,再经分离纯化而得到的含有磷酸丝氨酸基的肽。大量研究表明,

收稿日期: 2000-09-08; 修订日期: 2000-12-17.

基金项目: 江苏省科委九五攻关项目资助课题(BE98010).

作者简介: 胡俊刚(1975-),男,江苏镇江人,食品科学硕士研究生.

CPP 能在中性和偏碱性条件下阻止钙沉淀,促进钙在小肠中的吸收和利用^[1~5]. 因为生产 CPP 的原料酪蛋白是天然蛋白质,所以 CPP 作为食品添加剂使用不存在安全性问题,很容易被人们接受. 因此, CPP 由于其天然性和良好的补钙效果,正越来越受到人们关注. 美国、日本的科学家和企业家正在将它作为一种功能性食品的基料进行开发研究,而我国对 CPP 的研究还处于起步阶段. 因此,研究开发 CPP,对解决缺钙的营养问题、开发功能食品和药品有重要的意义.

CPP 的 $r(\text{N/P})$ 在一定程度上反映了肽链中磷酸丝氨酸基的密集程度. $r(\text{N/P})$ 越低,说明 CPP 中所含的磷酸丝氨酸基越多. 把 $r(\text{N/P})$ 在 7.0~7.6 的 CPP 制品称为初级品, $r(\text{N/P})$ 低于 5.5 的 CPP 制品称为高纯品. 有研究表明^[6], $r(\text{N/P})$ 较小的 CPP 阻止磷酸钙沉淀形成的效果要好于 $r(\text{N/P})$ 较高的 CPP 制品,所以有必要研制 CPP 高纯品.

由于 CPP 含有磷酸丝氨酸基,在一定的 pH 条件下 CPP 带负电荷,而不含磷酸丝氨酸基的肽(non-phosphopeptides,以下简称 NPP)带正电荷,所以可根据这一性质,用离子交换树脂去除 NPP,纯化 CPP. 国外虽有报导用阴离子树脂纯化 CPP^[7],但尚未报导用阳离子树脂纯化 CPP. 作者用阴离子交换树脂纯化 CPP 达到了较好的分离效果, CPP 的处理量达 35 g. 初步探讨了用阳离子树脂纯化 CPP 的可能性,研究了 pH 对阳离子树脂纯化 CPP 效果的影响,最后对两种离子交换树脂纯化 CPP 的效果进行了比较.

1 材料与方法

1.1 材料

CPP 初级品 $r(\text{N/P})$ 为 7.52 无锡轻工大学食品科学教研室自制; 大孔强碱性阴离子交换树脂南开大学化工厂生产; 凝胶型强酸性阳离子交换树脂江阴有机化工厂生产; 其他试剂均为市售分析纯.

1.2 主要仪器设备

D 5.5 cm×50 cm 层析柱 上海锦华层析设备厂生产; HL-1 型恒流泵 上海沪西仪器厂生产; 8802 型紫外检测仪 温州孚华分析仪器厂生产; XWD1-100 记录仪 上海自动化仪表三厂生产.

1.3 实验方法

1.3.1 总 N 测定 半微量凯氏定氮法^[8].

1.3.2 总 P 测定 Morrison 快速微量定磷法^[9].

1.3.3 $r(\text{N/P})$ 的计算 $r(\text{N/P}) = r(\text{总 N})/r(\text{总 P}) \times 31/14$

1.3.4 得率计算

$$P_0 = \frac{[P]_1 \times V_1}{[P]_0 \times W_0} \quad N_0 = \frac{[N]_1 \times V_1}{[N]_0 \times W_0}$$

$$\text{得率 1: } P_1 = \frac{[P]_2 \times V_2}{[P]_0 \times W_0} \quad N_1 = \frac{[N]_2 \times V_2}{[N]_0 \times W_0}$$

$$\text{得率 2: } P_2 = \frac{[P]_2 \times V_2}{[P]_1 \times V_1} \quad N_2 = \frac{[N]_2 \times V_2}{[N]_1 \times V_1}$$

式中: N_0 、 P_0 分别为上样液溶解的氮、磷得率; N_1 、 P_1 分别为洗脱液相对于进样前干 CPP 的氮、磷得率; N_2 、 P_2 分别为洗脱液不考虑溶解损失的氮、磷得率; $[P]_0$ 为 CPP 初级品中 P 质量分数(g/g); $[N]_0$ 为 CPP 初级品中 N 质量分数(g/g); $[P]_1$ 为上样液中 P 质量浓度(g/mL); $[N]_1$ 为上样液中 N 质量浓度(g/mL); $[P]_2$ 为洗脱液中 P 质量浓度(g/mL); $[N]_2$ 为洗脱液中 N 质量浓度(g/mL); V_2 为洗脱液体积(mL); V_1 为上样液体积(mL); W_0 为 CPP 上样量(g).

1.3.5 阴离子树脂纯化 CPP

CPP 在一定 pH 下带负电,而 NPP 带正电. 将一定浓度的 CPP 进样,带负电的 CPP 被吸附于阴离子树脂上,用清水将未被吸附的 NPP 洗出,然后再用一定浓度的 HCl 洗脱,得到 CPP 洗脱液.

离子交换树脂对带同种电荷的不同离子选择性不同,在使用时必须使被分离组分的离子选择性大于缓冲液中平衡离子的选择性. 由于 Cl^- 、 Ac^- 、 PO_4^{3-} 的选择性大小顺序为 $\text{Cl}^- > \text{PO}_4^{3-} > \text{Ac}^-$, 所以在使用前需将离子交换树脂的出厂型 Cl^- 型转为 Ac^- 型^[2,6].

分离条件为柱 D 5.5 cm×50 cm,进样浓度为 6%,进样量为 35 g,进样速度为 350 mL/h,洗脱速度为 400 mL/h,进样 pH 为 5.5,洗脱液为 0.2 mol/L HCl,检测波长为 220 nm.

取 35 g CPP 初级品,加入 500 mL 水充分搅拌,调节 pH 至 5.5,加水至溶液体积为 583.3 mL,搅拌 0.5 h,得 pH 5.5、质量浓度为 6 g/dL 的 CPP 悬浮液,3 000 r/min 离心 15 min,取上清液以 350 mL/h 的体积流量进样,同时测定上清液总氮、总磷含量,计算上清液的得率和 $r(\text{N/P})$. 进样结束后继续按同样的流速用清水进行洗脱,收集洗脱液,至第一峰完全洗出,得洗脱液 A. 然后洗脱速率增大为 400 mL/h,换用 0.2 mol/L HCl 继续进行洗脱,收集至第二峰完全洗出,得洗脱液 B. 测定洗脱液 A、B 的总氮、总磷含量,分别计算得率和 N/P .

1.3.6 阳离子树脂纯化 CPP

CPP 在一定 pH 下带负电,而 NPP 带正电.将一定浓度的 CPP 进样,带正电的 NPP 被吸附于阳离子树脂上,用清水将未被吸附的 CPP 洗出,得到 CPP 洗脱液.

阳离子树脂直接使用 H⁺ 型式的阳离子交换树脂.

分离条件为柱 D 为 5.5 cm×50 cm,进样质量浓度为 6 g/dL,进样量为 35 g,进样速度为 350 mL/h,洗脱速度为 350 mL/h,进样 pH 分别为 4.0, 5.0,6.0,检测波长为 220 nm.

CPP 进样液的配制同 1.3.5 并调节 pH. 进样结束后换用清水进行洗脱,收集洗脱液至第一峰完全洗出,测定洗脱液总氮、总磷含量,计算氮、磷得率和 $r(N/P)$.

2 实验结果

2.1 阴离子树脂纯化 CPP

2.1.1 洗脱曲线 在 220 nm 波长下连续测定和记录洗脱液的消光值,得洗脱曲线,见图 1.

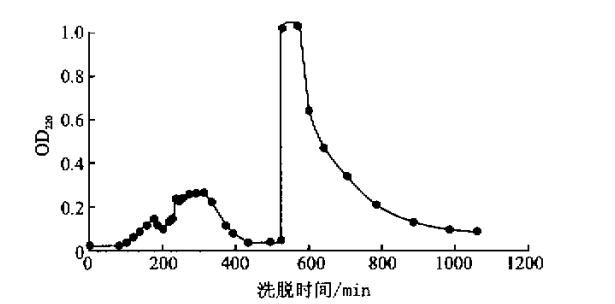


图 1 阴离子树脂纯化 CPP 的洗脱曲线
Fig.1 Elution curve of CPP purified by using an ion-exchange resin

2.1.2 分析测试结果 分别测定上清液、洗脱液 A、洗脱液 B 的总氮、总磷含量,计算得率和 N/P,结果见表 1.

表 1 阴离子树脂纯化 CPP 测试结果
Tab.1 Result of CPP purified by using an ion-exchange resin

项目	样 品		
	上清液	A 液	B 液
得率 N ₁	74.76%	12.11%	61.89%
得率 N ₂		16.20%	82.78%
得率 P ₁	86.71%	0.62%	85.59%
得率 P ₂		0.72%	98.71%
$r(N/P)$	6.48	147.43	5.44

注:A 液为用清水洗出的 NPP 洗脱液,B 液为用 0.2 mol/L HCl 洗出的 CPP 洗脱液.

2.2 阳离子树脂纯化 CPP

2.2.1 洗脱曲线 在 220 nm 波长下连续测定和记录洗脱液的消光值,得洗脱曲线,见图 2.

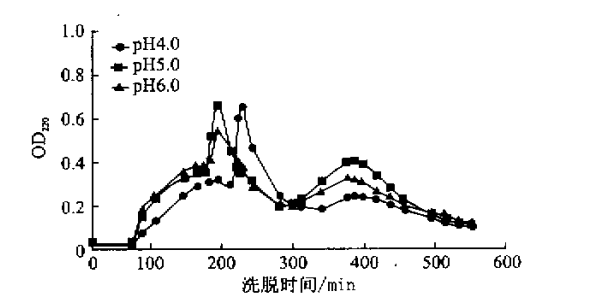


图 2 阳离子树脂纯化 CPP 的洗脱曲线
Fig.2 Elution curve of CPP purified by using cation-exchange resin

2.2.2 分析测试结果 进样 pH 为 4.0,5.0,6.0 时,分别得到洗脱液 2 830,2 795,2 965 mL,分别测定上清液、洗脱液的总氮、总磷含量,计算得率和 $r(N/P)$,结果见表 2.

表 2 阳离子树脂纯化 CPP 测试结果
Tab.2 Results of CPP purified by using cation-exchange resin

项目	pH 4.0			pH 5.0			pH 6.0		
	P 得率/%	N 得率/%	$r(N/P)$	P 得率/%	N 得率/%	$r(N/P)$	P 得率/%	N 得率/%	$r(N/P)$
上清液	91.18	78.44	6.48	82.28	77.81	7.11	78.71	95.17	9.09
得率 1	63.01	31.54	3.76	67.35	41.86	4.67	63.24	44.61	5.31
得率 2	69.11	40.21	3.76	81.85	53.80	4.67	80.35	46.93	5.31

3 讨 论

CPP 是含有磷酸丝氨酰基的肽.根据有关报导, CPP 的等电点(Isoelectric point, pI)在 pH 2~4 之间.当 CPP 溶液的 pH>pI 时, CPP 带负电荷,而 NPP 带正电,此溶液流经阴离子树脂时, CPP 被交

换吸附于柱上,而 NPP 则被清水洗出.在 NPP 被洗尽后,改变洗脱液的 pH 和离子强度进行洗脱,即可得到较纯的 CPP 溶液.

根据有关研究, CPP 的相对分子质量在 3 000~5 000 之间^[6],普通的离子交换树脂不适合分离这种分子质量为几千的多肽.本实验选用的阴离子

树脂是大孔强碱性阴离子交换树脂. 大孔树脂是近 30 年来在一般凝胶型树脂的基础上发展起来的一类新型树脂. 与一般凝胶型树脂相比, 大孔树脂孔道大、表面积大, 在交换过程中, 离子容易迁移扩散, 交换速度较快, 工作效率较高^[11]. 对于 CPP 这种相对分子质量较大的多肽, 大孔树脂较适用. 从图 1 和表 1 可以看到, 在现有的柱条件下, CPP 与 NPP 达到了较理想的分离, P 几乎没有损失, $r(N/P)$ 大幅降低, 所去除的均为 NPP. 用阴离子树脂纯化 CPP, 虽然达到了较好的分离效果, 但从工业化规模生产 CPP 高纯品的角度来看, 采用该法也有不足之处:

1) 树脂在使用前和再生时需转型处理, 能耗费用较大, 生产效率降低.

2) 总的分离时间较长, 且操作分为两步, 不利于扩大生产.

3) 洗脱时使用的是一定浓度的 HCl, 使最终产品带入了一定的盐分.

4) 从柱中洗脱下来的 CPP 溶液浓度很低, 后期浓缩干燥能耗费用较大.

基于这些问题, 作者试验了用阳离子树脂纯化 CPP.

与阴离子树脂纯化 CPP 的过程相反, 在用阳离子树脂纯化 CPP 的过程中, 被吸附的是 NPP, CPP 直接被清水洗脱下来, 得到较纯的 CPP 溶液. 通过酶解法得到的 CPP 初级品, 是由长短不一的短肽链组成的混合物, 它们所含磷酸丝氨酰基数量不同, 其等电点(pI)也有所差异. 由于磷酸根带净负电荷, 所以含磷酸丝氨酰基越多的肽, 其 pI 也就越低. 随着 pH 的提高, 一方面使得 pI 较低的 CPP 净负电荷密度增加, 另一方面使得 pI 较高的肽净正电荷密度减小或转为不带电. 因此, 在用阳离子树脂纯化 CPP 的过程中, CPP 溶液 pH 的增加是有利于清水洗脱液中 P、N 得率的增加和 $r(N/P)$ 的提高的. 但由于溶液的 pH 同时改变了 PO_4^{3-} 带电状态, 而且 CPP 初级品中含有 Ca^{2+} , 所以 pH 的改变就必然会影响到 CPP- Ca^{2+} 之间的相互作用, 导致了 CPP 在不同 pH 下的溶解性有所差异, 使得前面所提到的 pH 改变对于 $r(N/P)$ 、N、P 得率的变化规律受到了影响. 在表 1, 2 中列出了进样前溶解 CPP 初级品时因溶解度受 pH 影响而造成的损失及得率 1 和得率 2. 得率 1 是相对于进样前干 CPP 的得率, 得率 2 是不考

虑溶解损失的得率. 从图 2 可以看出, 随着 pH 的升高, 出峰速度加快. 这是因为随着 pH 的升高, CPP 负电荷密度增加, 使得更易被洗脱出来. 从表 2 中可以看出, 当从 pH 4.0 变为 pH 5.0 的过程中, P 得率、N 得率、 $r(N/P)$ 都是上升的, 与上面所描述的规律相吻合. 当从 pH 5.0 变为 pH 6.0 的过程中, 上清液中 P 得率下降, N 得率上升, 这就引起了得率 2 中 N、P 得率下降, 而 $r(N/P)$ 上升. 另外离子交换色谱的复杂性(例如交换过程中的分子排阻效应、各种扩散作用、配位效应等)也是影响得率和 $r(N/P)$ 的变化的因素. 综合 N、P 得率和 $r(N/P)$ 来看, pH 5.0 时纯化效果较好.

比较阴离子树脂和阳离子树脂纯化 CPP 的效果可以看出, 使用阳离子树脂纯化 CPP 有如下优点:

1) 阳离子树脂使用前无需转型处理.

2) 用阳离子树脂纯化洗脱 CPP 只需一步, 总操作时间只有采用阴离子树脂时的一半.

3) 用阳离子树脂纯化时洗脱用的是清水, 未带入盐分.

4) 从交换容量的角度来看, 在确保 $r(N/P) < 5.5$ 的前提下, 还可通过提高进样浓度来进一步提高得率, 这样洗脱液中 CPP 的浓度就可以提高, 减少了后面浓缩和干燥的费用.

可以看到, 通过进一步完善纯化条件, 不断优化阳离子树脂纯化 CPP 的过程, 阳离子树脂完全可以取代阴离子树脂, 成为纯化 CPP 的最佳工业手段之一.

4 展 望

对于采用阳离子树脂纯化 CPP, 作者只研究了不同 pH 对纯化效果的影响. 比较表 1, 2, 可以看到, 在这样的条件下阳离子树脂纯化 CPP 的 $r(N/P)$ 和得率都较低. 如果控制 CPP 的 $r(N/P) < 5.5$ 的前提下, 要进一步提高 N、P 的得率, 可考虑以下几个方面:

1) 提高进样浓度.

2) 提高进样和洗脱速度.

3) 在 CPP 中添加一些柠檬酸, 螯合一部分钙离子, 以提高 CPP 的溶解性, 同时改变 CPP 的带电的状况, 使其利于被洗脱.

参考文献：

- [1] PARK O, SWAISGOOD H E , ALLEN J C. Calciumbinding of phosphopeptides derived from hydrolysis of α_{s1} - casein or β - casein using immobilized trypsin[J] . **J Dairy Sci**, 1998 (81) 2850~2857.
- [2] HIROSHI N, ATSUKO K, TSUNEAKI I. In vivo formation of phosphopeptide with calcium-binding property in the small intestinal tract of the rat fed on casein[J] . **Agr Biol Chem**, 1972(36) :409~415.
- [3] ERIC C R, PETER F R, NICHOLAS J A. A selective precipitation purification procedure for multiple phosphoseryl - containing peptide and methods for their identification[J] . **Analytical Biochemistry**, 1994(217) :277~284.
- [4] REEVES R E, LATOUR N G. Calcium phosphate sequestering phosphopeptide from casein[J] . **Science**, 1958 :428~472.
- [5] BERROCAL R, CHANTON S, JULLIER M A, *et al* . Tryptic phosphopeptides from whole casein. II . Physicochemical properties related to the solubization of calcium[J] . **J Dairy Res**, 1989(56) 335~341.
- [6] 冯凤琴. 生物活性肽 - 酪蛋白磷酸肽的研究[D] . 无锡 无锡轻工大学, 1998.
- [7] PARK O, SWAISGOOD H E, ALLEN J C. Calcium binding of phosphopeptides derived from hydrolysis of α_s - Casein or β - Casein using immobilized trypsin[J] . **J Dairy Sci**, 1998(81) 2850~2857.
- [8] 黄伟坤. 食品检验与分析[M] . 北京 中国轻工业出版社, 1989. 49.
- [9] MORRISON W R. A fast, simple and reliable method for the microdetermination of phosphorus in biological materials[J] . **Analytical Biochemistry**, 1964(7) :218~224.
- [10] 华家桢, 奚国良, 易庆成等. 实用蛋白质化学技术[M] . 上海 上海科学技术出版社, 1982. 188.
- [11] 钱庭宝. 离子交换剂应用技术[M] . 天津 天津科学技术出版社, 1984.