

文章编号 :1009 - 038X(2001)03 - 0243 - 05

酪蛋白磷酸肽的体外功能试验

王瑛瑶¹, 胡俊刚¹, 杜东平², 王璋¹, 许时婴¹, 谢良¹

(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: 对不同级别的酪蛋白磷酸肽(Casein Phosphopeptide, 以下简称 CPP)促进钙吸收的体外功能性质进行了研究, 测定了 CPP 的结合钙量、CPP 阻止磷酸钙沉淀形成的效果及持钙能力。结果表明: CPP 对钙的结合量随温度的升高而减少, 随 pH 值的升高而增加; CPP 对阻止磷酸钙沉淀的作用随温度升高和溶液钙磷比增加而下降; 随氮磷摩尔比降低, CPP 阻止磷酸钙沉淀形成的最低有效浓度下降; 对于不同的钙磷比, CPP 的氮磷摩尔比越小, 保持在溶液中的钙量越多, 但每摩尔磷保持钙的摩尔数随氮磷摩尔比的降低而降低。

关键词: 酪蛋白磷酸肽, 氮磷摩尔比, 钙磷比

中图分类号: Q514.4

文献标识码: A

The External Functions of Casein Phospeptides

WANG Ying-yao¹, HU Jun-gang¹, DU Dong-ping², WANG Zhang¹,
XU Shi-ying¹, XIE Liang¹

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

Abstract: The properties of different grade casein phosphopeptide(CPP) in enhancing the absorption of calcium were studied. The content of the binding calcium of CPP, the effect of CPP on retarding the formation of calcium phosphate and the capacity of CPP keeping calcium soluble in solution were tested. From the results, the following conclusions were obtained. The content of the binding calcium of CPP decreased with the increase in temperature and increased with the increase in pH. The effect of CPP on retarding the formation of calcium phosphate decreased with the increase in temperature and the molar ratio of Ca to P in solution. With the reduction of the molar ratio of N to P in CPP, the minimum effective concentration of CPP decreased. At the different molar ratio of Ca to P, the lower the molar ratio of N to P in CPP, the more calcium soluble was kept in solution. However, the mole of calcium kept by per molar P in solution decreased with the decrease in the molar ratio of N to P.

Key words: Casein Phosphopeptide(CPP); molar ratio of N to P; molar ratio of Ca to P

动物体内 pH 值呈中性或碱性时, CPP 可阻止磷酸钙沉淀产生, 使溶解钙保持在较高水平, 从而

促进钙的吸收利用。CPP 的作用与 CPP 分子中磷酸基密度有关^[1, 2]。Berrrocal^[2]在 25 °C、pH 6.5 和 7.6

收稿日期: 2000 - 11 - 07; 修订日期: 2001 - 03 - 23.

基金项目: 江苏省科委九五科技攻关项目(BE98010)资助课题.

作者简介: 王瑛瑶(1978 -), 女, 浙江浦江人, 食品科学硕士研究生.

时测得 CPP 中的有机磷与结合钙的摩尔比约为 1:1. Lee^[3]等认为动物肠内数微摩尔的 CPP 可阻止 40~100 倍的钙沉淀. Satd^[4]也曾报导,在氯化钙溶液中加入少量的 CPP 和生理 pH 值的磷酸缓冲液,由于 CPP 的存在,磷酸钙形成可延迟至 12 h,且最终溶液中的 CPP 和钙的摩尔比为 1:40.

氮磷摩尔比一定程度上反映了肽链中磷酸丝氨酸基的密集程度,氮磷摩尔比越低,说明 CPP 中所含的磷酸丝氨酸基越多.按照氮磷摩尔比高低,可将 CPP 产品分为粗制品、初级品、精制品及高纯品.研究不同条件下不同级别 CPP 结合钙及持钙的能力,将有助于理解 CPP 的作用机制,评价 CPP 制品的优劣,还可为 CPP 使用条件的确定提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

CPP 系列产品 无锡轻工大学食品科学教研室自制.其中:粗制品 CPP1 16.85;初级品 CPP2 7.30;精制品 CPP3 5.69;高纯品 CPP4 3.91;其它试剂均为分析纯.

1.2 主要仪器与设备

501 型超级恒温水浴槽 上海县实验仪器厂生产;PXS-215 型离子活度计 上海雷磁仪器厂新泾分厂生产;GL-20B 冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂生产;低速台式离心机 上海医用分析仪器厂生产;PHS-3C 型精密 pH 计 上海雷磁仪器厂生产.

1.3 实验方法

1.3.1 总钙含量测定 高锰酸钾滴定法^[5]

1.3.2 CPP 产品结合钙量的测定

采用离子选择性电极测定^[6].

钙标准曲线的绘制:准确称取经 130 °C 烘干的 CaCl₂ 1.1099 g,分别用 0.5 mol/L 的 KCl 和 0.05 mol/L pH 7.4 的 Tris—HCl 的溶液溶解并定容到 100 mL 得 0.1 mol/L 的 CaCl₂ 标准液.依次操作,得浓度分别为 1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 1×10^{-2} , 1×10^{-1} mol/L 的 CaCl₂ 标准液.在 35 °C 下,将上述溶液由稀至浓逐个测定其平衡电位值,在半对数纸上以浓度为横坐标,以电位值为纵坐标作图,得 35 °C、pH 7.4 时钙标准曲线.35 °C、pH 7.0、25 °C、pH 7.0、25 °C、pH 7.4 各条钙标准曲线作法同上.

溶液中游离钙的测定:将 CPP 样品分别配成 50 mL 添加有 KCl, pH 7.4 或 pH 7.0 Tris—HCl 缓冲液的溶液.使溶液中 CPP、KCl 和 Tris—HCl 缓冲

液的浓度分别为 4 mg/mL、0.5 mol/L 和 0.05 mol/L.于 25 °C 和 35 °C 下用 PXS—215 型离子活度计和钙离子选择电极测定溶液的电位值,查标准曲线 2 并计算即可知各种条件下游离钙的浓度.

1.3.3 CPP 阻止磷酸钙沉淀形成的效果检测

CPP 阻止磷酸钙沉淀形成的效果用 pH—Stat 法检测^[2].在反应器中加入适量的 0.1 mol/L NaH₂PO₄ 和 CPP,使两者在 500 mL 反应体系中分别为 8 mmol/L 和 0、10、15、25、50、75、100、200 mg/L.溶液保温至一定温度(25 °C 和 35 °C)后加入 0.1 mol/L 的 CaCl₂ 溶液,使 CaCl₂ 溶液浓度为 8 mmol/L 且反应体系中 $r_{Ca}:r_P = 1:1$,其中 P 是指由 NaH₂PO₄ 所提供的以不同离解状态存在的磷酸根中的磷,下同.此时立即用 0.1 mol/L NaOH 将反应体系 pH 调至 7.2,并不断滴加 0.1 mol/L NaOH 使体系 pH 保持在 7.2.从调节 pH 时即开始计时,pH 调至 7.2 约需 2 min,从 2 min 开始连续记录 0.1 mol/L NaOH 的消耗量.以时间为横坐标,0.1 mol/L NaOH 的消耗量为纵坐标作图.

$r_{Ca}:r_P = 2:1$ 时,CaCl₂ 和 NaH₂PO₄ 在反应体系中的浓度分别为 12 mmol/L 和 6 mmol/L,其它操作步骤均相同.

1.3.4 CPP 溶液持钙力的测定 参考文献[6]进行.

2 结果与讨论

2.1 CPP 结合钙的性能研究

2.1.1 高锰酸钾滴定法测定各 CPP 中的钙 由表 1 可以发现,除 CPP4 外,氮磷摩尔比小的 CPP 产品总钙含量高.对经同样处理的产品,氮磷摩尔比越小,则产品中不含磷酸基的肽段被切除和分离的越多, CPP 肽链越短,磷酸基密度越高,因而束缚的钙量也越大,在酒精分级过程中, CPP 所结合的钙就多,从而导致产品中钙含量增加.

2.1.2 离子选择电极测定不同条件下不同 CPP 产品中游离钙浓度

根据 1.3.2 节钙标准曲线的绘制方法,得到不同 pH 不同温度条件下的钙标准曲线如下:

$$(1) \text{pH } 7.0, 25 \text{ } ^\circ\text{C} \text{ 钙标准曲线方程为: } y = -33.73x - 135.31 \quad R^2 = 0.9992;$$

$$(2) \text{pH } 7.0, 35 \text{ } ^\circ\text{C} \text{ 钙标准曲线方程为: } y = -32.96x - 128.93 \quad R^2 = 0.9972;$$

$$(3) \text{pH } 7.4, 25 \text{ } ^\circ\text{C} \text{ 钙标准曲线方程为: } y = -29.58x - 125.30 \quad R^2 = 0.9988;$$

表 1 各样品的含钙量*

Tab.1 The content of calcium of different samples

样品	氮磷摩尔比	钙质量分数/%
CPP1	16.85	4.756
CPP2	7.30	6.253
CPP3	5.69	6.949
CPP4	3.91	—

注:由于 CPP 高纯品是通过阳离子交换树脂纯化 CPP 初级品而得到,在纯化过程中 CPP 产品中钙离子被交换,因此 CPP 高纯品中钙含量很低,用高锰酸钾滴定法无法检出。

(4) pH 7.4、35 °C 钙标准曲线方程为: $y = -29.18x - 119.15$ $R^2 = 0.9985$ 。

测得不同级别 CPP 产品在不同条件下的溶液的电位值,根据钙标准曲线算得各产品游离钙浓度见表 2。

表 2 不同条件下不同 CPP 产品中游离钙浓度

Tab.2 The concentration of free calcium of different CPP at different conditions mmol/L

样品	氮磷摩尔比	pH 7.0		pH 7.4	
		25 °C	35 °C	25 °C	35 °C
CPP1	16.85	3.495	3.685	3.12	3.451
CPP2	7.30	4.050	4.330	3.483	3.898
CPP3	5.69	4.836	5.060	4.40	4.791
CPP4	3.91	0.040	0.053	0.038	0.050

2.1.3 由总钙浓度和游离钙浓度得到结合钙浓度从表 2 中可以看出,在 CPP 产品中的游离钙含量,高纯品要较初级品和精制品低两个数量级,从而使 2.1.1 的推论得到了验证,由于未得到 CPP4 的总钙含量,因此表 3 中 CPP4 的数据未列出。从表 3 可以看到,在相同的 pH 值和温度条件下,各 CPP 结合钙量的大小依次为 CPP2、CPP3、CPP1。CPP3 和 CPP1 的结合钙量随氮磷摩尔比减小而增大,氮磷摩尔比小说明产品磷酸基密度大,产生的结果是束缚钙量增多,因而结合钙量大。CPP2 由于在制备过程中为了提高产品的溶解性而添加了一定量柠檬酸,柠檬酸对 CPP 结合钙有一定促进作用,因此导致了 CPP2 结合钙量的增加。在相同的 pH 值下,35 °C 下各 CPP 结合钙量都比 25 °C 下各 CPP 结合的钙量要小,这是因为随着温度升高, CPP 分子中钙所受的束缚力减小,使钙多以游离态存在,游离钙含量增多,结合钙含减少。在相同的温度下, pH

值从 7.0 升高 7.4, CPP 所带负电荷增多,对钙离子的结合能力增强,因而结合钙量增多。

表 3 不同条件下不同 CPP 产品的结合钙量

Tab.3 The content of binding calcium of CPP at different conditions

样品	氮磷摩尔比	总钙浓度/ (mol/L)	pH 7.0		pH 7.4	
			25 °C	35 °C	25 °C	35 °C
CPP1	16.85	4.756	1.261	1.071	1.636	1.305
CPP2	7.30	6.253	2.203	1.923	2.770	2.355
CPP3	5.69	6.949	2.113	1.889	2.549	2.158
CPP4	3.91	—	—	—	—	—

2.1.4 不同条件下 CPP 产品中结合钙磷摩尔比从表 4 可以看出,结合钙量最小的 CPP1 中每摩尔磷结合钙的摩尔数最大值为 0.7855。氮磷摩尔比最小的 CPP3 结合钙量虽然比 CPP1 多,但结合钙磷摩尔比最大只有 0.4746。说明磷酸基密度高的产品,结合钙量大,但折算到每个磷酸基来看功效未必强。

表 4 CPP 中每摩尔磷结合钙的量

Tab.4 The mole of calcium kept by per molar P in CPP

样品	氮磷摩尔比	pH 7.0		pH 7.4	
		$r_{Ca}:r_P$	$r_{Ca}:r_P$	$r_{Ca}:r_P$	$r_{Ca}:r_P$
		25 °C	35 °C	25 °C	35 °C
CPP1	16.85	0.6059	0.5149	0.7855	0.6269
CPP2	7.30	0.5864	0.5122	0.7368	0.6267
CPP3	5.69	0.3938	0.3523	0.4746	0.4021
CPP4	3.91	—	—	—	—

2.2 不同氮磷摩尔比的 CPP 阻止磷酸钙沉淀形成的效果

在有 $CaCl_2$ 和 NaH_2PO_4 存在的溶液体系中, $Ca_3(PO_4)_2$ 的自发生成涉及以下反应:



两步反应都有 H^+ 释放出来,所以可用 pH-stat 法检测 CPP 对这些反应的影响。为使反应体系的 pH 值保持在一指定值(pH 7.2)而加入 NaOH 的速度(NaOH 的加入量随时间推移而增加)较小时,可认为反应体系中 CPP 样品阻止磷酸钙沉淀形成的效果较好。以反应时间为横坐标,NaOH 的消耗量为纵坐标作图 1。

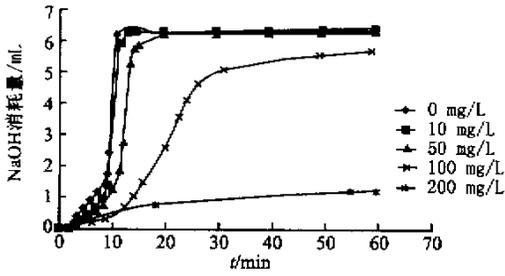


图1 25 °C、氮磷摩尔比为1:1时不同质量分数的CPP4阻止磷酸钙沉淀形成效果图

Fig. The effect of different concentrations of CPP4 on retarding the formation of calcium phosphate at the conditions of 25 °C and Ca/P = 1:1

图1给出了CPP4在25 °C、氮磷摩尔比为1:1时阻止磷酸钙沉淀形成效果图,其它不同CCP在不同条件下阻止磷酸钙沉淀形成效果图与图1相似.图1中每条曲线的横向和纵向切线的相交点所对应的时间即为沉淀达最大值所需时间,将不同CPP

表5 不同条件下CPP阻止磷酸钙沉淀的效果

Tab.5 The effect of CPP on retarding the formation of calcium phosphate at different conditions

条件	CPP1		CPP2		CPP3		CPP4	
	A (mg/L)	B /min						
25 °C $r_{Ca}:r_P = 1:1$	50	15.5	15	43.8	10	42.0	10	60.0
35 °C $r_{Ca}:r_P = 1:1$	100	6.4	50	18.4	25	20.8	50	26.0
35 °C $r_{Ca}:r_P = 1:1$	100	11.2	75	20.7	50	28.3	50	24.2

2.3 CPP的持钙能力

CPP的持钙能力即一定条件下被CPP保持在溶液中的钙量的大小.各CPP溶液经一系列的处理后,用高锰酸钾法滴定其中的钙.在有钙离子和磷酸根存在的溶液体系下,pH呈碱性时,将有磷酸钙沉淀形成.CPP的存在可以减少因磷酸钙沉淀而引起的钙损失,使更多的钙保持溶解状态.35 °C下钙磷摩尔比为1:1和2:1时CPP保持在溶液中的钙量见表6、7.

从表6可以看出, $r_{Ca}:r_P = 1:1$ 时于35 °C保持1 h后不含CPP的溶液体系钙的损失达59.6%,而200 mg/L的CPP1、CPP2、CPP3、CPP4可使钙损失率分别降到7.49%、5.94%、3.91%、3.25%;160 mg/L的CPP1、CPP2、CPP3、CPP4可使钙损失率分别降到13.98%、7.66%、5.28%、6.45%.若折算成CPP中每摩尔磷所能保持的钙的摩尔数,则氮磷摩尔比大的CPP分子每摩尔磷保持钙的能力大.

从表7可以看出, $r_{Ca}:r_P = 2:1$ 时于35 °C保持

在不同条件下阻止磷酸钙沉淀形成效果图中添加200 mg/L的CPP时沉淀达最大所需时间记为 B ,CPP在对应条件下的最低有效质量浓度记为 A ,见表5.

由表5可知, A 值越小, B 值越大,表明CPP的作用效果越好.从表中可以看出,温度从25 °C升高到35 °C,CPP作用效果减弱,这是因为体系温度升高,沉淀反应速度加快的缘故.在相同的温度和钙磷摩尔比下,氮磷摩尔比小的CPP产品作用效果明显比氮磷摩尔比大的产品好,这说明CPP的作用与CPP制品内磷酸基密度有关,磷酸基密度越大则效果越好.常人膳食中合理的钙磷摩尔比约为1:1,需要补钙的人群如婴幼儿、孕妇及老年人,膳食中钙的含量应适当增加,钙磷摩尔比提高到2:1左右为宜.表5中在35 °C时,钙磷摩尔比从1:1增加到2:1时 A 值、 B 值增大,这说明CPP的作用效果不仅与磷酸基密度有关,还与制品组成有关.

1 h后不含CPP的溶液体系钙的损失达49.3%,添加200 mg/L的CPP1、CPP2、CPP3、CPP4可使钙损失率分别降到18.52%、15.31%、13.20%、11.67%;160 mg/L的CPP1、CPP2、CPP3、CPP4可使钙损失率分别降到20.02%、15.77%、13.90%、12.31%.CPP分子每摩尔磷保持钙的摩尔数仍随氮磷摩尔比增大而增大.

从表6和表7可见,在钙磷摩尔比为1:1和2:1时,相同浓度的CPP能保持在溶液中的钙量随氮磷摩尔比增大而减小,这与前述实验结果是一致的(在2.2中不同氮磷摩尔比的CPP阻止磷酸钙沉淀形成的效果).比较CPP分子中每摩尔磷的持钙量,可以发现,在两种钙磷比下,氮磷摩尔比大的CPP的钙磷摩尔比均大于氮磷摩尔比小的CPP,这与表4比较后发现,每摩尔有机磷结合钙的量较大的CPP,每摩尔有机磷持钙能力也较强.结合钙的量大说明某一瞬间被CPP分子所束缚的钙较多,即有较多的钙得到CPP分子的保护而未被沉淀,因而被保

持在溶液中的钙离子也较多。

表 6 35 °C 下钙磷摩尔比为 1:1 时 CPP 保持在溶液中的钙量

Tab.6 The content of calcium kept by CPP in solution at the condition of 35 °C and Ca:P = 1:1

样品	氮磷摩尔比	CPP 质量浓度/(mg/L)	总钙质量分数	溶解钙质量分数	钙损失率/%	钙磷摩尔比*
去离子水	—	—	3.2×10^{-4}	1.290×10^{-4}	59.6	—
CPP1	16.85	200	3.2×10^{-4}	2.960×10^{-4}	7.49	39.91
		160	3.2×10^{-4}	2.753×10^{-4}	14.00	43.67
CPP2	7.30	200	3.2×10^{-4}	3.010×10^{-4}	5.94	22.76
		160	3.2×10^{-4}	2.955×10^{-4}	7.66	27.54
CPP3	5.69	200	3.2×10^{-4}	3.075×10^{-4}	3.91	16.50
		160	3.2×10^{-4}	3.031×10^{-4}	5.28	20.11
CPP4	3.91	200	3.2×10^{-4}	3.096×10^{-4}	3.25	13.61
		160	3.2×10^{-4}	2.994×10^{-4}	6.45	16.05

表 7 35 °C 下 Ca:P = 2:1 时 CPP 保持在溶液中的钙量

Tab.7 The content of calcium kept by CPP in solution at the condition of 35 °C and Ca:P = 2:1

样品	氮磷摩尔比	CPP 质量浓度/(mg/L)	总钙质量分数	溶解钙质量分数	钙损失率/%	钙磷摩尔比*
去离子水	—	—	4.8×10^{-4}	2.434×10^{-4}	49.3	—
CPP1	16.85	200	4.8×10^{-4}	3.911×10^{-4}	18.5	35.37
		160	4.8×10^{-4}	3.839×10^{-4}	20.0	42.06
CPP2	7.30	200	4.8×10^{-4}	4.065×10^{-4}	15.3	21.64
		160	4.8×10^{-4}	4.043×10^{-4}	15.8	26.68
CPP3	5.69	200	4.8×10^{-4}	4.166×10^{-4}	13.2	16.04
		160	4.8×10^{-4}	4.133×10^{-4}	13.9	19.67
CPP4	3.91	200	4.8×10^{-4}	4.240×10^{-4}	11.67	13.64
		160	4.8×10^{-4}	4.209×10^{-4}	12.31	16.76

注: 钙磷摩尔比 = (CPP 存在时溶解钙摩尔数 - 不存在 CPP 时溶解钙摩尔数) / CPP 中有机磷摩尔数。

3 结 论

1) CPP 对钙的结合量随温度的升高而减少, 随 pH 值的升高而增加; CPP 的氮磷摩尔比越低, 结合钙量越大, 但每摩尔磷结合的钙量下降; 含有柠檬酸的 CPP 结合钙量增加。

2) CPP 对阻止磷酸钙沉淀的作用随温度升高而下降, 在相同的温度条件下, 氮磷摩尔比小的 CPP 产品作用效果明显比氮磷摩尔比大的产品好。

3) CPP 的持钙能力随氮磷摩尔比的降低和 CPP 浓度的增加而增大, 然而每摩尔磷保持钙的摩尔数随氮磷摩尔比的降低而降低。

参考文献:

- [1] SATO R, NOGUCHI T, NAITO H. The necessity for the phosphate portion of casein molecules to enhance Ca absorption from the small intestine[J]. *Agric Biol Chem*, 1983, 47(10): 2415 ~ 2417.
- [2] BERROCAL R, CHANTON S, JUILLER M A, et al. Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium[J]. *J Dairy Res*, 1989, 56: 335 ~ 341.
- [3] LEE Y S, NOGUCHI T, NAITO H. Intestinal absorption of calcium in rats given diets containing casein or amino acid mixture: the role of casein phosphopeptide[J]. *Br J Nutr*, 1983, 49: 67 ~ 76.
- [4] SATO R, NOGUCHI T, NAITO H. Casein phosphopeptide enhance calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine[J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 1986, 32: 67 ~ 76.
- [5] 黄伟坤编著. 食品检验与分析. 北京: 中国轻工出版社, 1989.
- [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.