

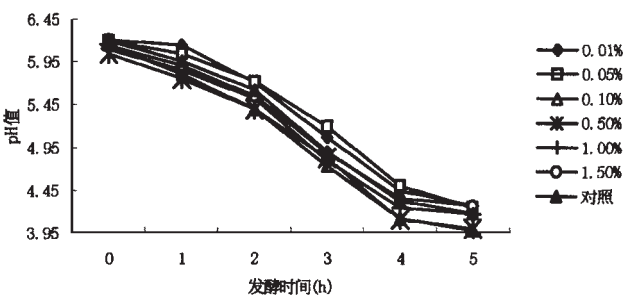


图 4 各样品的 pH 值随时间的变化关系曲线

表 3 各样品活菌记数结果

浓度(%)	0.01	0.05	0.10	0.50	1.00	1.50	> 2.00	对照
活菌数 ($\times 10^8$)	5.0	6.3	26.0	14.0	11.0	3.5	↓	11.5
(CFU/ml)								

3 结论

菊芋酶解液对双歧杆菌有一定的作用 ; 菊芋水解

液对双歧杆菌有明显的促进作用 ; 先水解后酶解的菊芋溶液对双歧杆菌的促生长作用最为显著。

参考文献

- 1 杨翔华等 . 双歧杆菌的保健作用及在我国的应用 . 食品科学 ,1997 ,18(3) :40 ~ 43.
- 2 陈有容等 . 微生态活性豆奶的研究 . 中国食品学报 ,1998 ,2(3) :20 ~ 26.
- 3 杜连起 . 菊芋在面包生产中的应用 . 食品科学 ,1997 ,18(9) :34 ~ 36.
- 4 李雪驼等 . 寡糖的含义及作用和在改善肠道内环境上的意义(上) . 中国微生态学杂志 ,1997 ,9(5) :48 ~ 53.
- 5 张庆蕴等 . 异麦芽寡糖对双歧杆菌生长促进作用的体外试验 . 中国微生态学杂志 ,1998 ,10(2) :70 ~ 72.
- 6 卫扬保 . 微生物生理学 . 北京 :高等教育出版社 ,1989.
- 7 Gibson et al . Enrichment of bifidobacteria from human gut contents by oligofructose using continuous cultiure . FEMS Microbiol. Lett, 1994, 118(1 ~ 2): 121 ~ 128.

生物活性肽 – 酪蛋白磷酸肽 (CPP) 的研制

蔡为荣 薛正莲 安徽机电学院生化工程系 芜湖 241000

摘 要 摸索了 2709 碱性蛋白酶水解酪蛋白制备 CPP 的最佳工艺条件 : 底物浓度 10%、用酶量 1500 μ /g 反应温度 45 $^{\circ}$ C、pH10. 5、反应时间 150min。采用选择沉淀法分离 CPP ,在 pH4. 5 添加 1. 1% CaCl $_2$ (w/v) 和 50%(v/v) 乙醇 ,室温沉淀 4h ,得到 CPP 产品的 N/P、得率分别为 6. 39% 和 13. 94%。

关键词 酪蛋白磷酸肽 2709 碱性蛋白酶 酪蛋白

Abstract In this study, alcalase was used for producing CPP by hydrolyzing casein. The optimum conditions: casein concentration 10%, enzyme usage 1500u/g substrate, temperature 45 $^{\circ}$ C, pH10. 5 and time 150mins were determined. A selective precipitation procedure was also used to isolate CPP from the hydrolyzate of casein. The N/P ratio and the yield of CPP obtained by adding 1. 1% CaCl $_2$ (w/v) and 50% (v/v) alcohol to the hyrolyzate at pH4. 5 were 6. 39% and 13. 94% respectively.

Key words Casein phosphopeptide 2709 alcalase Casein

CPP 是牛乳酪蛋白经酶水解、分离纯化而得到的一类富含磷酸丝氨酸的肽类化合物。它可作为无机离子的载体促进肠膜对钙、铁、硒尤其是钙的吸收和利用^[1,2],它还具有明显的抗蛀牙功能^[3]、防止钙丢失^[4]等诸多生理功能。我国第三次营养调查表明人们膳食营养素中以钙缺乏最为显著,摄入量仅为 RDA 的

50% ,某些地区儿童佝偻病发病率高达 40% ,中、老年骨质疏松病患者也很普遍^[5] ,所以 CPP 作为唯一的促钙吸收的活性肽在我国有着巨大的市场,我国在这方面的研究刚刚起步,加速对 CPP 的开发与研究具有重要的现实意义。本文系统的介绍了用 2709 碱性蛋白酶制备 CPP 的最佳工艺过程 ,为工业化生产 CPP 提供理

论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

酪蛋白(上海生化试剂厂), 2709 碱性蛋白酶(食品级 无锡酶制剂厂 10 万 u/g), 其它试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 分析方法

总氮的测定:按微量凯氏定氮法^[6];总磷的测定:按 Mirrison 微量快速定磷法^[7];酶活测定:按福林试剂法^[8];水解程度的测定:按甲醛滴定法^[6];N/P 摩尔比为:总氮/总磷 $\times 31/14$;CPP 得率(%)为:CPP 总氮含量/所用酪蛋白总氮含量 $\times 100$ 。

1.2.2 制备 CPP 酶解工艺的优化

固定底物浓度 10% (底物浓度过大时反应液粘度大难以操作, 浓度低欠经济, 通过实验 10% 浓度较为合适), 在不同酶浓度、反应温度、反应 pH 和反应时间条件下, 分析碱性蛋白酶对酪蛋白的水解作用, 水解程度以 1.0mol/L NaOH 溶液滴定体积(ml)表示。

1.2.3 制备 CPP 分离条件的优化

将上述最佳酶解条件下得到的水解液调至 pH4.5, 离心除去沉淀, 上清液分别调至不同的 pH, 加入 1.1% CaCl₂(w/v)和 50%(v/v)乙醇, 室温放置不同时间, 离心得沉淀, 经真空干燥得 CPP 产品。

2 结果与讨论

2.1 CPP 产品评定指标

由于 CPP 功能性质(促进钙的吸收和利用)要通过体外模拟或活体动物试验才能给予评定, 因此功能性质不适作为评定指标。CPP 的分子结构决定其功能性质, 但多肽的测定非常复杂, 因此 CPP 的分子结构也不可能作为评定指标。CPP 产品中的 N/P 值较客观地反映了 CPP 肽链的长短及磷酸基的密度, 因酪蛋白分子内含有磷酸基的数目是一定的, N/P 值越小, 则产品中不含磷酸基的肽段被切除和分离得越多, CPP 的肽链就越短、磷酸基密度、产品的纯度也就越高。因此 N/P 可作为 CPP 的特性指标。得率的大小与产品量的回收及经济效益直接相关, 也是一个重要的工艺指标。得率不仅与酪蛋白的水解液中 CPP 的回收率有关, 还与产品的纯度和磷酸基密度密切相关。工艺优化的目的应是生产有较低 N/P 的 CPP, 同时具有较高的得率。

2.2 制备 CPP 最适酶解工艺的确定

实验表明, 当底物浓度为 10% 时, 酪蛋白经碱性蛋白酶水解制备 CPP 的最适酶反应体系为: 酶浓度 1500u/g 底物(图 1) 反应温度 45℃(图 2) pH10.5(图 3) 反应时间 150min(图 4)。

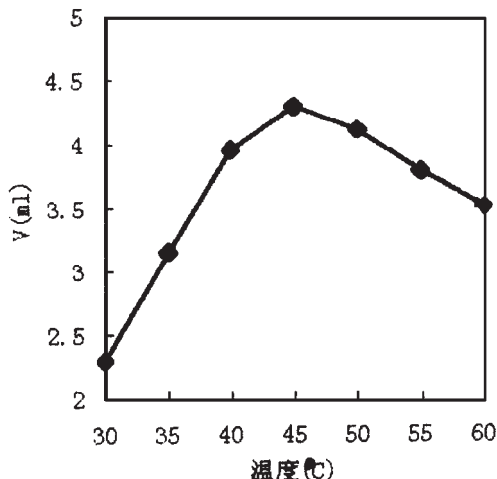


图 1 酶浓度与水解程度的关系

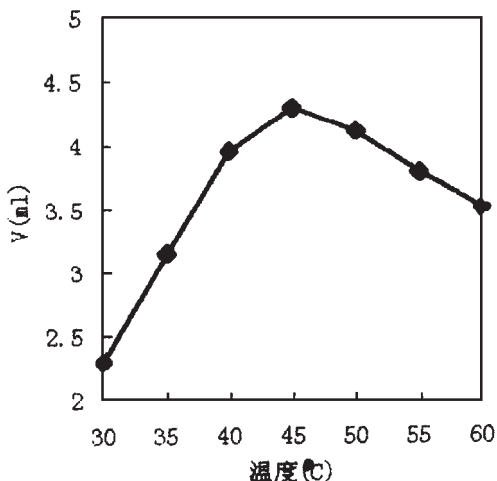


图 2 反应温度与水解程度的关系

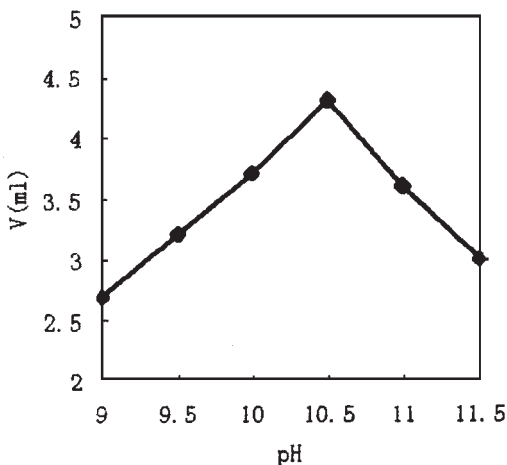


图 3 反应 pH 与水解程度的关系

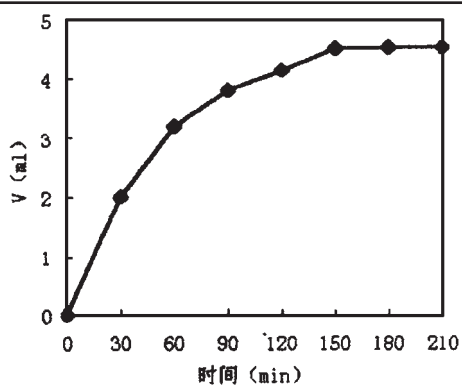


图 4 反应时间与水解程度的关系

2.3 pH 对 CPP 沉淀形成的影响

水解上清液是 CPP 和非磷酸化多肽(NPP)的混合物,混合物中各组分的结构、带电基团及等电点都有所不同,因此用 CaCl₂ - 乙酸沉淀 CPP 时,不同沉淀 pH 必将对制得 CPP 产品的组分(N/P)及得率有较大的影响。pH 对 CPP 沉淀形成的影响见表 1。

表 1 不同沉淀 pH 对 CPP 沉淀的影响

pH	N/P	得率(%)
3.0	5.95	8.51
4.5	6.31	12.95
6.5	8.27	12.05
8.0	10.07	11.12

* 表 1 中数据为沉淀 2h 所得值

由表 1 可见,在 pH3.0 时,N/P 和得率都最低。由于 CPP 本身是一个混合组分,其等电点一般在 pH1 ~ 3^[9],pH3.0 离 CPP 分子等电点较近,所带负电荷较弱,与钙离子形成的交联度较低,所以沉淀不完全,得率较低。随着 pH 的升高,离 CPP 的等电点也越远,其上的磷酸基解离度增强, CPP 分子与钙离子形成较强的交联,使其得率上升。但随着 pH 的进一步上升, CPP 分子侧链上的一些酸性基团及末端羧基也解离带负电,使得交链状的 CPP 颗粒带较多的 NPP 中一些较大的分子很易沉淀,因此出现了高 N/P 却没有高得率。由上表可看出,沉淀 pH 为 4.5 时得到 CPP 产品的 N/P 较低,而得率最高。

2.4 沉淀时间对 CPP 沉淀形成的影响

将 CaCl₂ 及乙醇分别加入水解上清液(pH4.5)中,在室温放置不同时间后离心,所得 CPP 产品的 N/P 和得率见表 2。

表 2 沉淀时间对 CPP 沉淀的影响

沉淀时间(h)	N/P	得率(%)
0	6.15	9.85
2	6.29	13.31
4	6.38	13.90
6	6.65	13.85

由表 2 可知,延长时间有利于 CPP 与钙离子的交联、絮凝沉淀。随着沉淀时间的延长, CPP 的 N/P 值有增大趋势,得率随着沉淀时间的延长而增大并趋于恒定。结合 N/P 及得率得出最适沉淀时间为 2 ~ 4h。

由以上的研究得出 2709 碱性蛋白酶水解酪蛋白制备 CPP 的最佳工艺为:底物浓度 105、酶浓度 1500u/g 底物、反应温度 45℃、反应 PH10.5、反应时间 150min、沉淀 pH4.5、沉淀时间 2 ~ 4h。在此工艺条件下制得 CPP 产品的 N/P 及得率分别为 6.39% 和 13.94%。

参考文献

- 1 Hansen M. et al. Pediatric Res, 1996, 40(4): 547 ~ 550.
- 2 Ootsuka Ryuich. Absorption effect of mineral components in CPP, Gekkan Fudo Kemokrall, 1995, 11(10): 55 ~ 60.
- 3 Reynold EC. et al. Dent. Res, 1995, 74(6): 1272 ~ 1276.
- 4 Tsuchita H. Dietary CPP prevent bone loss in aged ovariectomized rats, J. Nutr, 1996, 126(1): 86 ~ 93.
- 5 葛可佑等. 90 年代中国人群的膳食与营养状况. 人民卫生出版社, 1996.
- 6 张龙翔等. 生活实验方法与技术. 高等教育出版社, 1997.
- 7 W. R. Morrison. A fast, simple and reliable method for the microdetermination of phosphorus in biological materials, Analytical Biochemistry, 1964, 7: 218 ~ 224.
- 8 邬显章. 酶制剂工业生产技术. 吉林出版社, 1988.
- 9 内藤博はか. 特许公报(B2)平 2 - 7616.