

酶法脱磷酸化修饰酪蛋白酸钠及其体外模拟消化

胡锦涛^{1,2,3}, 王园园¹, 刘大松¹, 周鹏^{1,2,3*}

1(江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡, 214122) 2(江南大学 食品学院, 江苏 无锡, 214122)

3(江南大学 食品安全与营养协同创新中心, 江苏 无锡, 214122)

摘 要 以小牛肠碱性磷酸酶修饰酪蛋白酸钠(sodium caseinate, SC)为研究对象, 制备得到4种磷酸化水平的SC。采用尿素电泳、微波消解-紫外可见吸收光谱和超高效液相-电喷雾-离子化-飞行时间质谱等表征手段, 从不同角度鉴定了SC的脱磷酸化程度, 并在模拟婴幼儿胃、肠液中考察了不同的脱磷酸化程度对SC体外消化的影响。结果表明, SC脱磷酸化程度越高, 在模拟胃液中分散程度越均匀, 降解速度越快; 并且在模拟肠液中进一步降解时所产生的多肽分子量越小, 消化性越好。

关键词 酪蛋白酸钠(SC); 小牛肠碱性磷酸酶(CAP); 脱磷酸化水平; 模拟婴幼儿胃肠液消化; 超高效液相-电喷雾-离子化-飞行时间质谱

母乳富含生长所必需的脂肪酸、蛋白质和乳糖等, 易于消化吸收; 并且含有特异性和非特异性的免疫物质, 有助于增强新生儿的疾病抵抗力^[1]。实际生活中, 母乳的供给量远不能满足婴幼儿成长的需求^[2], 婴幼儿配方奶粉成为母乳的典型替代品之一。

牛乳具有良好的营养性和功能性, 但是其在蛋白组成、含量、营养和功能性等方面仍与人乳有着显著差异^[3]。牛乳 β -酪蛋白是完全磷酸化的, 含5个磷酸基团; 而人乳 β -酪蛋白的磷酸化水平则呈现多分布模式, 有6种磷酸化水平(分别含有0, 1, 2, 3, 4和5个磷酸基团), 以含2个和4个磷酸基团的形式为主。

从分子水平上修饰牛乳, 使其更加接近人乳组成, 有利于婴幼儿配方奶粉更好的替代母乳^[4]。本文选取了小牛肠碱性磷酸酶(calf intestinal alkaline phosphatase, CAP)对酪蛋白酸钠(sodium caseinate, SC)进行脱磷酸化修饰, 鉴定了蛋白的脱磷酸化程度, 并探讨SC的不同蛋白磷酸化水平对其在模拟婴幼儿胃、肠液中消化性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SC、CAP(10 DEAU/mg 固体)、胃蛋白酶(3 200

U/mg 蛋白)、胰蛋白酶(10 000 BAEEU/mg 蛋白)、牛血清清蛋白、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC), 美国 Sigma 公司; 丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺等, 美国 Amresco 公司; 盐酸、硝酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)等, 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

BenchTop Pro 冷冻干燥机, 美国 VirTis 公司; Optima L-80 XP 超速离心机, 美国 Beckman Coulter 公司; Protean II xi Cell 电泳仪、GelDox XR 凝胶成像仪, 美国 Bio-rad 公司; MARS 微波消解仪, 美国 CEM 公司; Platform ZMD 4000 液质联用仪、MALDI SYNAPT 液质联用仪, 美国 Waters 公司; LSM-780 激光共聚焦显微镜, 德国 Zeiss 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 CAP 脱磷酸化修饰 SC

在 pH 9.0 和 0.8 U/mL CAP(Tris-HCl 缓冲液)的反应条件下, 酶溶液与 5 mg/mL SC 溶液等比例混合, 在不同时间点取样后于 80 ℃ 的水浴灭活, 待冷却后在 4 ℃ 下透析, 冷冻干燥。SC 与不含酶的 Tris-HCl 缓冲液混合, 0 min 时按照灭酶过程处理, 得到对照组样品。每个时间点做 2 组平行, 不同反应时间的样品用尿素电泳分析。

1.3.2 模拟婴幼儿胃肠液消化

模拟婴幼儿体外消化采用 DIDIER DUPONT^[5]等的模型, 首先配制模拟胃液(SGF)和模拟肠液(SIF), 加样后, 胃蛋白酶浓度为 22.75 U/mg 蛋白, 于 37 ℃ 下消化, 每隔 10 min 取样, 调 pH 至 7.0 终止反应。

第一作者: 博士, 副教授(周鹏教授为通讯作者, E-mail: zhoupeng@jiangnan.edu.cn)。

基金项目: 国家自然科学基金(31471697); 教育部科学技术研究项目(113032A)

收稿日期: 2016-01-29, 改回日期: 2016-03-30

将胃消化 60 min 之后的消化液与 SIF 等体积混合,胰蛋白酶浓度 3.45 U/mg 蛋白,37 ℃ 消化按设定时段取样,95 ℃ 下加热 10 min 终止酶反应。

1.3.3 电泳

尿素电泳(urea polyacrylamide gel electrophoresis, Urea-PAGE):浓缩胶浓度为 4%,分离胶浓度为 10%,每块胶上样量为 30 μL。脱色后的胶板用凝胶成像仪拍照。

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE):浓缩胶和分离胶的浓度分别是 4% 和 15%,上样量为胃液 10 μL 和肠液 20 μL。脱色后的胶板用凝胶成像仪拍照。

1.3.4 磷含量测定

总磷含量的测定采用微波消解-紫外吸收光谱法。无机磷含量的测定首先用双缩脲(Biuret)法测样品(5 mg/mL)在 540 nm 处的吸光度值,计算蛋白浓度。然后将样品溶液与 30% 的三氯乙酸按 1:1 比例混合,在 660 nm 测吸光度值。根据蛋白含量和上清液中磷的含量,可以计算样品中无机磷的含量。

1.3.5 超高效液相-电喷雾-离子化-飞行时间质谱

将蛋白样品溶于 pH 8.0 的氨水溶液中,10 000 g 常温离心 5 min,取上清液过 0.45 μm 的滤膜,滤液进行液质联用鉴定。

色谱条件:选用 BEC C₄(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司)色谱柱,流动相 A 液和 B 液分别是 100% 的乙腈和 0.1% 的甲酸, B 液从 90% 到 0% 再升到 90% 进行梯度洗脱。

质谱条件:离子化选用阳离子模式(+ESI),锥孔电压 40 V,碰撞能量 6 eV,质荷比(m/z) 500 ~ 3 000,扫描时间 1 s,扫描时间间隔 0.02 s。用 Mass-Lynx V 4.1 和 MassEnt 1 软件(Waters)分析数据。

1.3.6 激光共聚焦成像

FITC 标记后的样品溶液在 488 nm 激发波长下观察不同脱磷酸化程度的牛乳蛋白在胃液中絮凝结构的变化。

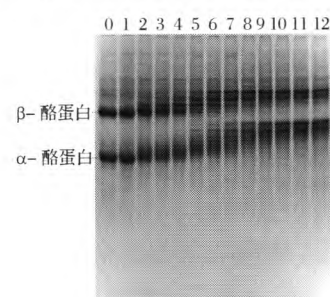
2 结果与分析

2.1 制备不同脱磷酸化程度的 SC

碱性磷酸酶是一种分子质量在 160 ~ 190 kDa 之间的复合体,每个分子含有 4 ~ 5 个锌离子^[6]。在优化条件下用碱性磷酸酶修饰蛋白,α_s-酪蛋白和

β-酪蛋白的脱磷酸化程度可以达到 94.6% 和 92.8%^[7]。

本研究选用了 CAP 修饰 SC,0 min 时,SC 中的 β-和 α-酪蛋白没有发生脱磷酸化反应,可能分别含有 5 个和 8 个磷酸基团。反应 0.5 h 时,β-酪蛋白主要呈现 4 条清晰的条带,迁移率都低于泳道 1 的条带,可能分别代表了 4 种(1、2、3、4)磷酸化水平;α-酪蛋白也呈现多个条带,表现出不同的磷酸化水平。随着反应时间的延长,泳道中蛋白条带数增多,磷酸化水平分布变大。当反应 2 h 及以上时,磷酸基团进一步被脱除,蛋白所带净负电荷下降,迁移率减小,蛋白条带减少,磷酸化水平分布变小。反应 7 h 后,β-酪蛋白含有一个主要条带,迁移率最小,磷酸基团可能被完全脱除;而 α-酪蛋白中可能含有 0 或 1 个磷酸基团。



(0) SC 对照组;酶反应时间(1)0 min,(2)10 min,(3)20 min,(4)0.5 h,(5)1 h,(6)1.5 h,(7)2 h,(8)3 h,(9)4 h,(10)5 h,(11)6 h,(12)7 h

图 1 不同反应时间 CAP 对 SC 脱磷酸化修饰的 Urea-PAGE 图

Fig. 1 Urea-PAGE electrophoresis of SC modified by CAP for different time

2.2 不同程度脱磷酸化 SC 的鉴定分析

根据 Urea-PAGE 的结果,选取 CAP 脱磷酸化修饰 0 min、0.5 h 和 7 h 的 SC 进行脱磷酸化程度的分析。脱磷酸化修饰 0 min 的样品(CAP-SC1)对应未脱除磷酸基团的 SC;修饰 0.5 h 的样品(CAP-SC4)对应部分脱除磷酸基团的 SC,其磷酸化水平分布模式接近人乳蛋白;修饰 7 h 的样品(CAP-SC12)对应高度脱磷酸化的 SC。

2.2.1 SC 中磷含量的变化

经 CAP 脱磷酸化修饰,未脱磷、部分脱磷和高度脱磷酸化的 SC 中总磷(Pt)、无机磷(Pi)、有机磷(Po)和磷酸基团的脱除率($R\%$)如表 1 所示。在未脱磷的 SC 中,磷酸化水平分布模式接近人乳蛋白的 SC,其中有机磷含量为 3.39 μg/mg,只脱除了 45.7% 的磷酸基团。高度脱磷酸化的 SC 中,磷酸基团的脱除率为 71.5%。

表 1 不同程度脱磷酸化 SC 中各种磷的含量
Table 1 The distribution of phosphorus in SC dephosphorylated by CAP

项目	CAP-SC1	CAP-SC4	CAP-SC12
Pt/($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	6.52 ± 0.04	3.66 ± 0.02	2.05 ± 0.02
Pi/($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	0.28 ± 0.03	0.27 ± 0.04	0.27 ± 0.01
Po/($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	6.24	3.39	1.78
R/%		45.7	71.5

注:CAP-SC1、CAP-SC4 和 CAP-SC12 分别对应 CAP 脱磷酸化修饰 0 min 和 0.5 h、7 h 后得到的未脱磷、部分脱磷和高度脱磷酸化的 SC。

2.2.2 SC 中磷酸基团个数的变化

用超高效液相-电喷雾-离子化-飞行时间质谱鉴定了磷蛋白和含磷肽段中磷酸基团的个数^[8]。酶法脱除丝氨酸残基上的磷酸基团时,只有 HPO_3^- 被脱除,因此每脱除一个磷酸基团,质量数减少 80 Da。

图 2 为 CAP 修饰 SC 后 β -酪蛋白质量数的变化。在未脱磷的 SC 中, β -和变体 β -酪蛋白的质量数是 23 982 Da 和 23 999 Da,含有 5 个磷酸基团^[9]。脱除部分磷酸基团后, β -酪蛋白及其变体分别减少了 80 Da、160 Da、240 Da 和 320 Da,形成 4 种衍生的 β -和

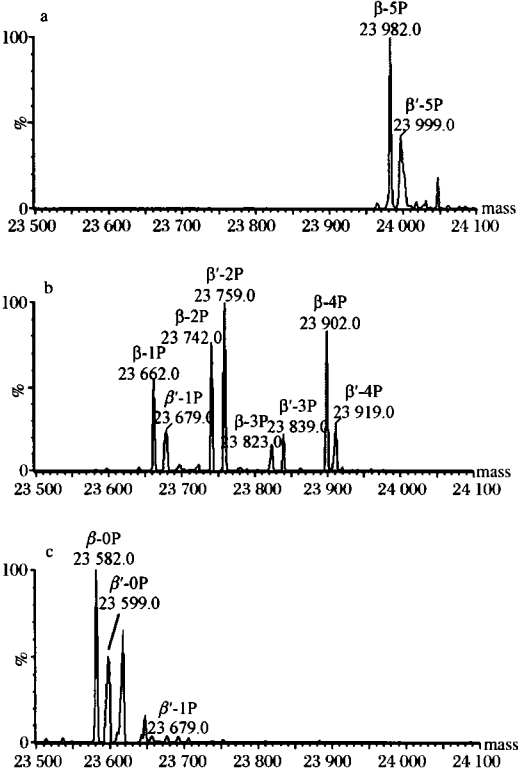


图 2 CAP 脱磷酸化修饰 0 min、0.5 h 和 7 h 后得到的未脱磷(a)、部分脱磷(b)和高度脱磷酸化(c)的 SC 中 β -酪蛋白去卷积质谱图

Fig.2 Deconvoluted mass spectrum of β -casein in SC (a), partially dephosphorylated SC (b) and highly dephosphorylated SC (c) modified by CAP for different time (0 min, 0.5 h and 7 h)

变体 β -酪蛋白。图 2(b)上 23 742 Da 和 23 759 Da 处的两个峰信号最强,说明此时 β -酪蛋白主要脱除了 3 个磷酸基团,与图 1 中泳道 4 的 β -酪蛋白条带分布结果一致,分布模式接近人乳 β -酪蛋白。在高度脱磷酸化的酪蛋白酸钠中, β -酪蛋白的质量数减少了 400 Da,磷酸基团被完全脱除。

图 3 显示了 SC 中 α_{s1} -酪蛋白质量数的变化。图 3(a)中, α_{s1} -和变体 α_{s1} -酪蛋白的质量数为 23 612 Da 和 23 628 Da,均含有 8 个磷酸基团。图 3(b)显示了 α_{s1} -酪蛋白脱除了 3、4 和 5 个磷酸基团;变体 α_{s1} -酪蛋白质量数变化显示分别含有 6、5、4 和 3 个磷酸基团。图 3(c)仅有 22 972 Da 处一个强峰,表明 α_{s1} -酪蛋白基本完全脱磷酸化,只有少量的 α_{s1} -和变体 α_{s1} -酪蛋白含有 1 个磷酸基团。

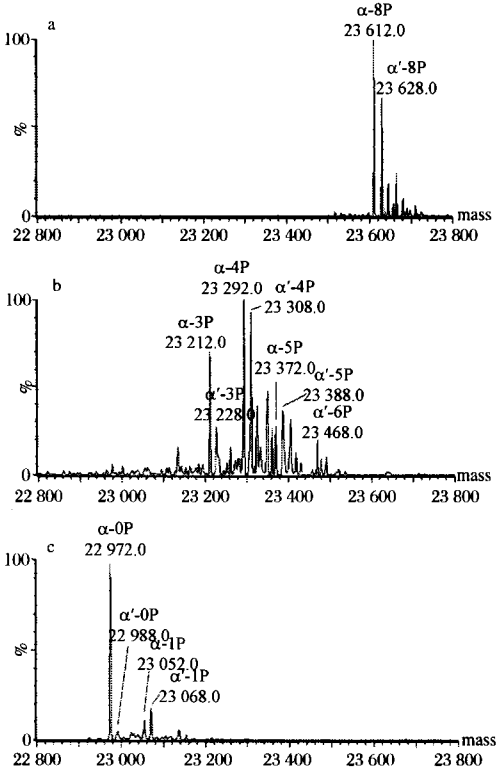


图 3 CAP 脱磷酸化修饰 0 min、0.5 h 和 7 h 后得到的未脱磷(a)、部分脱磷(b)和高度脱磷酸化(c)的 SC 中 α_{s1} -酪蛋白去卷积质谱图

Fig. 3 Deconvoluted mass spectrum of α_{s1} -casein in SC (a), partially dephosphorylated SC (b) and highly dephosphorylated SC (c) modified by CAP for different time (0 min, 0.5 h and 7h)

2.3 酶法脱磷酸化修饰对牛乳蛋白体外消化的影响

胃肠道消化性是评估食物营养性和致敏性的重要依据^[10]。脂肪和热变性乳清蛋白可以保护酪蛋白不被消化,而酪蛋白中含磷酸基团的序列可能导致交

又过敏^[11]。研究不同脱磷酸化程度的 SC 和乳蛋白浓缩物在婴幼儿胃肠道中的消化情况,对脱磷酸化修饰的牛乳蛋白在婴幼儿食品中的应用具有重要意义。选取了未脱磷、部分脱磷(磷酸化水平分布模式接近人乳蛋白)和高度脱磷的样品,模拟婴幼儿体外胃肠

道消化,研究乳蛋白磷酸化水平对其消化性的影响。

2.3.1 脱磷酸化 SC 在胃液中的絮凝结构

经 CAP 脱磷酸化修饰后,未脱磷的、部分脱磷的和高度脱磷的 SC 在模拟婴幼儿胃液中的絮凝结构如图 4 所示。

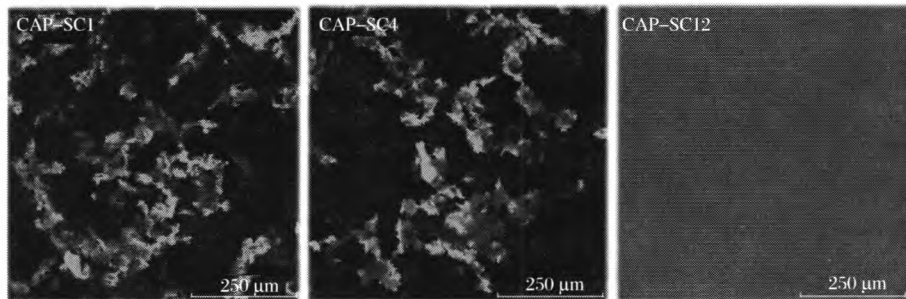


图 4 CAP 脱磷酸化修饰 0 min、0.5 h 和 7 h 后得到的未脱磷(CAP-SC1)、部分脱磷(CAP-SC4)和高度脱磷酸化(CAP-SC12)的 SC 在胃液中的激光共聚焦图

Fig. 4 CLSM of SC (CAP-SC1), partially dephosphorylated SC (CAP-SC4) and highly dephosphorylated SC (CAP-SC12) in simulated infant gastric fluid

观察发现,当 SC 脱除部分磷酸基团,即其磷酸化水平分布模式接近人乳组成时,在模拟婴幼儿胃液中则形成疏松的絮凝结构。当 SC 脱除大量磷酸基团时,其在模拟婴幼儿胃液中分散均匀,无絮凝结构产生。牛乳酪蛋白脱除磷酸基团后,蛋白分子的等电点升高,其在模拟胃液的酸性环境中(pH 2~4)所带的净正电荷增加,蛋白分子之间的静电斥力变大,相互聚集形成絮凝的程度降低。LI 等研究表明,蛋白在胃液中形成的絮凝结构越疏松,胃蛋白酶的活性中心越容易接近底物蛋白,因而蛋白在胃液中的消化速度也就越快^[12]。

2.3.2 脱磷酸化 SC 在胃肠液中消化后的电泳图

经 CAP 脱磷酸化修饰后,未脱磷、部分脱磷和高度脱磷的 SC 在模拟婴幼儿胃液和肠液中的消化过程如图 5 所示。

未脱磷的 SC 在胃液中随着消化时间的延长, β -和 α -酪蛋白所对应的条带强度逐渐降低;经胃蛋白酶消化后,在肠液中随着消化时间的延长, β -和 α -酪蛋白所对应的条带强度进一步降低,位于其下方的低分子量多肽的条带强度也进一步增强,且条带逐渐呈现模糊分布模式,说明 β -酪蛋白和 α -酪蛋白逐渐被降解成低分子量的多肽。相比而言,部分脱磷的和高度脱磷的 SC 在模拟婴幼儿胃液和肠液中逐渐被降解、产生低分子量多肽的速度更快,而且高度脱磷的 SC 的降解速度显著高于部分脱磷的 SC。研究结果表明,在模拟婴幼儿胃、肠液中,高度脱磷(即低磷酸化水平)的 SC 更易被消化降解。这与 CLSM 的结果相类

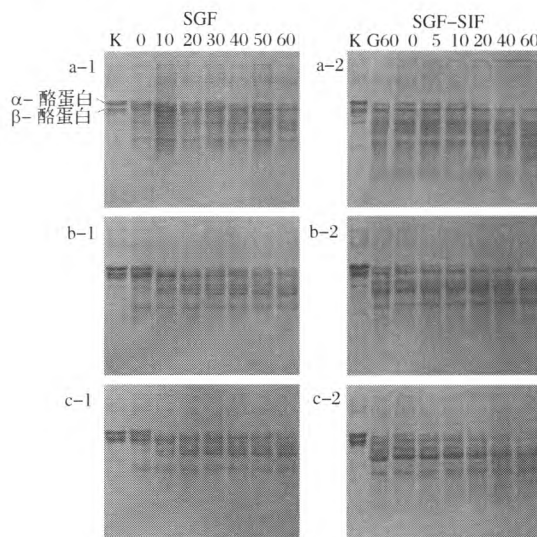


图 5 CAP 脱磷酸化修饰 0 min、0.5 h 和 7 h 后得到的未脱磷(a)、部分脱磷(b)和高度脱磷酸化(c)的 SC (经过胃液(1)消化后,再经肠液(2)消化的 SDS-PAGE 图。胶版上方泳道对应的数字为反应时间(min),K 代表消化前的对照组。)

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of SC (a), partially dephosphorylated SC (b) and highly dephosphorylated SC (c) subjected to gastric (1) or gastrointestinal (2) *in vitro* digestion

似,蛋白在胃液中形成的絮凝结构越疏松,其在胃液中的消化速度也就越快^[12],有利于婴幼儿消化吸收。

3 结论

本文通过 CAP 对 SC 进行不同程度的脱磷酸化

水平研究,通过尿素电泳、微波消解-紫外可见吸收光谱和超高效液相-电喷雾-离子化-飞行时间质谱全面、准确地表征了牛乳蛋白酶法脱磷酸化的程度,进一步比较了不同脱磷酸化程度的 SC 在模拟婴幼儿胃、肠液中的消化性,研究结果表明,在 pH 9.0 和酶浓度 0.8 U/mL 的反应条件下,CAP 修饰 SC 可以制备得到 4 种(1、2、3、4)磷酸化水平的 β -酪蛋白。SC 脱磷酸化程度越高,其在模拟婴幼儿胃液中分散得越好。未脱除磷酸基团时,蛋白形成致密的絮凝结构;部分脱除磷酸基团,即其磷酸化程度分布模式接近人乳蛋白时,形成类似于人乳的疏松絮凝结构;高度脱磷酸化时,蛋白在胃液的酸性环境中分子间静电斥力增大,相互聚集的程度降低,分散均匀,无絮凝结构产生。随着脱磷酸化程度的增加,SC 在模拟婴幼儿胃、肠液中降解的越快,产生的多肽分子量越小,消化性越好。

参 考 文 献

- [1] 张兰威,周晓红. 人乳早期乳汁中蛋白质,氨基酸组成与牛乳的对比分析[J]. 中国乳品工业, 1997, 25(3): 39-41.
- [2] WHO G, UNICEF N Y, WHO G, et al. Protecting, promoting and supporting breast feeding: the special role of maternity services[J]. Nursing Journal of India, 1993, 84(3):173-174.
- [3] JIMENEZ H F J R. Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision[J]. Journal of Dairy Science, 2004, 87(6):1 641-1 674.
- [4] LIU D S, WANG Y Y, YU Y, et al. Effects of enzymatic dephosphorylation on infant *in vitro* gastrointestinal digestibility of milk protein concentrate [J]. Food Chemistry, 2016, 197: 891-899.
- [5] DUPONT D, MANDALARI G, MOLLÉ D, et al. Food processing increases casein resistance to simulated infant digestion [J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2010, 54(11): 1 677-1 689.
- [6] WHITNEY R M. The Minor Proteins of Bovine Milk [J]. Journal of Dairy Science, 1958, 41(10):1 303-1 323.
- [7] LORENZEN P C, REIMERDES E H. Enzymatic dephosphorylation of caseins and creaming behaviour of o/w emulsions stabilized with dephosphorylated casein fractions[J]. Food, 1992, 36(6):595-599.
- [8] LEE C H, MCCOMB M E, BROMIRSKI M, et al. On-membrane digestion of β -casein for determination of phosphorylation sites by matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole/time-of-flight mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2001, 15(3): 191-202.
- [9] SWAISGOOD H E. Chemistry of the Caseins[M]. Springer US, 2003:139-201.
- [10] MILLS E N C, JENKINS J A, Alcocer M J C, et al. Structural, biological, and evolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2004, 44(5): 379-407.
- [11] BERNARD H, MEISEL H, CREMINON C, et al. Post-translational phosphorylation affects the IgE binding capacity of caseins[J]. FEBS Letters, 2000, 467(2): 239-244.
- [12] LICHAN E, NAKAI S. Enzymic dephosphorylation of bovine casein to improve acid clotting properties and digestibility for infant formula[J]. Journal of Dairy Research, 1989, 56(3):381-390.

Enzymatical dephosphorylation of sodium caseinate and the effect on digestibility

HU Jin-hua^{1,2,3}, WANG Yuan-yuan¹, LIU Da-song¹, ZHOU Peng^{1,2,3*}

1 (State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

2 (School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

3 (Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT This study was focused on the enzymatical dephosphorylation of sodium caseinate (SC) using calf intestinal alkaline phosphatase. The prepared β -casein with four phosphorylation levels was investigated by urea polyacrylamide gel electrophoresis, microwave digestion-ultraviolet visible absorption spectrum and ultra-performance liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry, respectively. The effect of phosphorylation levels on digestibility was also studied. The highly dephosphorylated SC can evenly dispersed in simulated infant gastric fluid without the formation of flocculation and the digestibility in both the simulated infant gastric and intestinal fluid increased.

Key words sodium caseinate; calf intestinal alkaline phosphatase; dephosphorylation; digestibility; ultra-performance liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry