

蛋清肽 - 钙配合物体内促钙吸收作用研究

韩 樱, 何 慧*, 赵宁宁, 李江涛, 王真真, 聂志奎

(华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘 要: 目的: 为了考察蛋清肽 - 钙配合物(EWP-Ca)在动物体内的补钙效果。方法: 将 60 只 Wistar 雄性大鼠随机分为 6 组: 普通组、缺钙模型组、CaCO₃ 组以及低、中、高剂量 EWP-Ca 组, 通过构造缺钙大鼠模型, 进行了为期 30d 的补钙实验, 实验结束后对各种与补钙相关的指标进行测定。结果: 与缺钙模型组相比, 高剂量 EWP-Ca 组(Ca 剂量为 106.4mg/(kg·d))能极显著增加大鼠股骨直径、干质量、骨钙含量及股骨密度($P < 0.01$), 极显著降低血清碱性磷酸酶(AKP)活力($P < 0.01$); 与钙含量相同的 CaCO₃ 组相比, EWP-Ca 高剂量组股骨直径、骨钙含量极显著和显著增加($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论: EWP-Ca 具有体内促进钙吸收作用, 且效果优于钙含量相同的 CaCO₃。

关键词: 蛋清肽; 蛋清肽 - 钙配合物; 促钙吸收; 补钙制剂

Effect of Egg White Peptide Binding with Calcium on Promotion of Calcium Absorption *in vivo*

HAN Ying, HE Hui*, ZHAO Ning-ning, LI Jiang-tao, WANG Zhen-zhen, NIE Zhi-kui

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Objective: To explore the promoting effect of egg white peptide binding with calcium (EWP-Ca) on calcium absorption *in vivo*. Methods: Totally 60 male Wistar rats were randomly divided into 6 groups: normal group, calcium-deficient model group, CaCO₃ group and EWP-Ca groups at low, medium and high doses. Calcium-deficient model rats were fed a low-Ca diet, and calcium absorption-related indices were determined after a feeding period of 30 days. Results: EWP-Ca at high dose (106.4 mg/(kg·d)) could significantly increase femur diameter, dry weight, calcium content and bone mineral density ($P < 0.01$) and could significantly decrease the activity of serum alkaline phosphatase (AKP) ($P < 0.01$) when compared with calcium-deficient model control group. Moreover, compared with CaCO₃ group at the same calcium level, femur diameter ($P < 0.01$) and bone calcium content ($P < 0.05$) were significantly increased. Conclusion: EWP-Ca can promote calcium absorption *in vivo*, which is better than CaCO₃ at the same calcium level.

Key words: egg white peptide; egg white peptide binding with calcium (EWP-Ca); calcium absorption-promoting effect; calcium supplement

中图分类号: TS253.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)11-0262-04

我国是世界上最大的蛋品生产国, 但目前蛋品加工水平却较低、技术陈旧, 同时由于某些饮食习惯和行业的特殊需求, 对蛋黄的需求量较大, 比如做月饼、蛋黄派等, 其副产物——蛋清常被低值利用甚至被当成废弃物丢弃, 也污染了环境^[1]。蛋清蛋白是食物中最理想的优质蛋白质, 其氨基酸组成非常适合人体需要, 利用率高达 99.6%, 但由于其受热易凝固等性质也使其应用受到了一定程度的限制^[2]。而将其酶法改性后却能得到具有多种生理活性的蛋清肽(egg white peptides, EWP), 使其附加值大大提高。

钙是人体必需的常量元素, 参与机体多种生理活动。人类缺钙是全球性的营养问题, 可导致人体产生

骨质疏松、佝偻症等多种疾病, 甚至对心血管也会产生极大的负作用, 然而人们却一直找不到有效、经济的钙源补充^[3]。小肽能与钙离子形成可溶性螯合物, 完整地转运吸收, 需要时又能有效地将钙离子释放出来, 同时还能补充一定的氨基酸^[4]。与其他补钙剂相比, 它更易被快速吸收, 稳定性更好。

国内外已有不少学者研究了肽 - 钙配合物、氨基酸 - 钙螯合物的补钙作用。Choi 等^[5]研究了卵黄高磷蛋白磷酸肽的钙结合能力, 实验组的饲料中加入 0.125%~0.5% 卵黄高磷蛋白磷酸肽 - 钙配合物, 结果发现实验组的 SD 大鼠的骨密度和骨矿物质含量较空白组显著提高, 表明卵黄高磷蛋白磷酸肽 - 钙配合物能够有效提高钙的生物利

收稿日期: 2011-06-18

作者简介: 韩樱(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品化学。E-mail: kekebeibei@126.com

* 通信作者: 何慧(1960—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品化学。E-mail: hehui@mail.hzau.edu.cn

用率,促进钙质沉积于骨骼。菅景颖^[6]对胶原多肽-钙配合物的研究表明,其无论是在对骨质疏松的治疗和预防,还是在促进骨骼生长和壮骨方面,效果均十分理想,效果优于葡萄糖酸钙和 CaCO_3 。但目前尚未见有研究蛋清肽-钙配合物(EWP-Ca)补钙功能的报道。本实验首次对EWP-Ca促钙吸收功能进行研究,通过在最优化条件下制得的EWP-Ca,饲喂缺钙大鼠一个月,研究该配合物对处于生长期的大鼠的骨骼发育的影响,为该产

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Wistar大鼠,雄性,SPF级,体质量(80 ± 5)g,购自湖北省疾病预防控制中心,许可证号:SCXK(鄂)2008-0005。

按照文献[7]的方法制备EWP-Ca,再经截留分子质量为5kD的超滤膜处理,收集膜透过级分,冻干,其钙结合率为16.45%。

CaCO_3 (优级纯) 国药集团化学试剂有限公司;血清钙试剂盒、血清磷试剂盒、血清碱性磷酸酶试剂盒 南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

AA-6300C原子吸收分光光度计 日本岛津公司;XR-36双能X线骨密度仪 美国Norland公司;5810/R低温高速冷冻离心机 德国Eppendorf公司;I型游标卡尺 南京三丰机电有限公司。

1.3 方法

1.3.1 自制缺钙饲料和普通饲料

实验为建立缺钙模型,自制缺钙饲料,配方见表1。经原子吸收法测定,其中钙含量为0.01%。为了保证基础营养成分的一致,同时自制了钙含量0.35%的普通饲料,其中钙来源于添加的 CaCO_3 。

表1 饲料成分表
Table 1 Feed composition

组分	缺钙饲料	普通饲料	%
大米蛋白(干基65%)	32	32	
色拉油	4.4	4.4	
葡萄糖	27	27	
玉米淀粉	27	27	
纤维素	3	3	
蛋氨酸	0.1	0.1	
胆碱	0.2	0.2	
矿物质混合物	4.7	5.0(其中0.35%为 CaCO_3)	
维生素混合物	1.0	1.0	

1.3.2 EWP-Ca的制备

双酶法制备蛋清肽参照文献[7]方法,将上清液过

截留分子质量为5kD的超滤膜,滤液冷冻干燥得蛋清肽粉,配制成4g/100mL的初始肽液,在55℃、pH9.5、肽粉与 CaCl_2 质量比2.5:1的条件下,与0.5g/mL CaCl_2 溶液混合搅拌20min,经过乙醇沉淀、离心分离及冷冻干燥后,制得EWP-Ca。

1.3.3 指标测定

钙含量测定参照文献[8]所述方法进行;粗蛋白含量测定:采用微量凯氏定氮法^[9];多糖含量测定:参照GB/T 9695.31—2008《肉制品 总糖含量测定》方法。

1.3.4 分组与给药方式

大鼠经适应性喂养5d后,随机分为6组,每组10只,分别为普通组、缺钙模型组、 CaCO_3 组和EWP-Ca低、中、高剂量组。各组动物喂以对应的饲料,普通组和缺钙模型组灌胃去离子水。EWP-Ca低、中、高剂量组,分别为每天灌胃不同剂量的EWP-Ca; CaCO_3 组每天灌胃 CaCO_3 ,折算钙元素含量与EWP-Ca高剂量组相同。灌胃量为0.3mL。每两天称量一次动物体质量。具体方法见表2。

表2 实验分组列表
Table 2 Rat grouping

组别	饲料	灌胃剂量(以Ca元素计)/(mg/(kg·d))
普通组	普通饲料	等体积去离子水
缺钙模型组	缺钙饲料	等体积去离子水
CaCO_3 组	缺钙饲料	CaCO_3 106.4
低剂量	缺钙饲料	EWP-Ca 26.6
EWP-Ca组 中剂量	缺钙饲料	EWP-Ca 53.2
高剂量	缺钙饲料	EWP-Ca 106.4

注:灌胃剂量设置参考人体(成年人体质量60kg)每日需摄入钙含量800mg,换算为13.3mg Ca/(kg·d),而低、中、高剂量分别设定为人体剂量的2、4、8倍,对应为26.6、53.2、106.4mg Ca/(kg·d)。

实验至30d后,将动物摘眼球处死,收集血液,4℃、10⁴r/min离心15min,取出血清。同时取出两侧股骨,分别放入烘箱中60℃条件下烘干至恒质量。

1.3.5 血清钙、磷及碱性磷酸酶测定

参照南京建成生物工程研究所试剂盒方法测定。

1.3.6 股骨干质量、长度、直径、骨密度及骨钙含量的测定

取出大鼠左侧股骨,用游标卡尺精确测定长度、股骨中心直径。采用Norland XR-36双能X线骨密度仪测定左股骨骨密度。取右侧烘干后的股骨称量股骨干质量,再经混和酸(硝酸、高氯酸体积比4:1)湿法消化后,以0.5%的氯化锶溶液定容,采用原子吸收分光光度计测定骨钙含量。

1.4 数据统计与处理

运用SPSS统计软件包进行单因素方差分析和LSD检验。

2 结果与分析

2.1 大鼠饲料组分分析

表3 饲料组分分析

Table 3 Analysis of feed ingredients

种类	钙含量/%	粗蛋白含量/%	多糖含量/%
普通饲料	0.35	20.8	61.1
低钙饲料	0.01	21.2	60.7

大鼠对各种营养物质含量的需求为蛋白质>20%，碳水化合物>60%，钙元素约0.5%。由表3可知，普通饲料组分测定结果基本可满足大鼠正常生长的需要，不会产生营养缺乏病；缺钙饲料则要求钙含量<0.1%，故也符合要求。

2.2 蛋清肽-钙配合物对大鼠血清指标的影响

表4 饲喂蛋清肽-钙配合物对大鼠血清指标的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Table 4 Effect of EWP-Ca on serum indices of rats($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	血清钙含量/ (mmol/L)	血清磷含量/ (mmol/L)	血清碱性磷酸酶活力/ (金氏单位/100mL)
普通组	1.892 ± 0.108**	2.181 ± 0.180	59.50 ± 9.13**
缺钙模型组	1.430 ± 0.142	2.178 ± 0.269	83.59 ± 10.96
CaCO ₃ 组	2.098 ± 0.143**	2.191 ± 0.488	62.59 ± 6.72**
低剂量	1.928 ± 0.151**	2.010 ± 0.377	79.70 ± 6.81
EWP-Ca组 中剂量	1.948 ± 0.114**	2.040 ± 0.169	59.36 ± 13.71**
高剂量	2.131 ± 0.149**	2.201 ± 0.275	49.26 ± 9.41** $\Delta\Delta$

注：*与缺钙模型对照组比较，差异显著($P < 0.05$)；**与缺钙模型对照组比较，差异极显著($P < 0.01$)； Δ 与CaCO₃组比较，差异显著($P < 0.05$)； $\Delta\Delta$ 与CaCO₃组比较，差异极显著($P < 0.01$)。下同。

由表4可知，缺钙模型组大鼠血清钙含量极显著低于其余5组($P < 0.01$)，说明通过饲喂自制的缺钙饲料来构造缺钙模型是成功的；各组之间血清磷含量差异均不显著($P > 0.05$)；除低剂量EWP-Ca外，其余4组的血清碱性磷酸酶(AKP)的活力均极显著低于缺钙模型组($P < 0.01$)，且高剂量EWP-Ca组明显低于相同钙剂量的CaCO₃组，两者之间差异达极显著水平($P < 0.01$)。血清AKP是由成骨细胞释放，在肝脏功能正常的情况下，血清AKP水平能较好地反映成骨细胞的活动状况，是骨形成的特异性指标。血清中的AKP主要来自肝脏与骨骼，当处于一些疾病状态下AKP会释放进入血清。缺钙模型组的血清AKP最高，说明该组动物由于缺钙严重，出现了高骨转换状态，因此AKP值不断上升，这与刘忠厚^[10]研究骨质疏松导致的高骨转换率时，AKP明显升高的结论相一致。

2.3 蛋清肽-钙配合物对大鼠股骨指标的影响

2.3.1 蛋清肽-钙配合物对大鼠股骨长度、直径的影响

表5 饲喂蛋清肽-钙配合物对大鼠股骨长度、股骨直径的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 5 Effect of EWP-Ca on femur length and femur diameter of rats
($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	股骨长度	股骨直径/mm
普通组	30.34 ± 0.70	3.42 ± 0.25
缺钙模型组	30.86 ± 1.33	3.56 ± 0.21
CaCO ₃ 组	31.10 ± 1.31	3.54 ± 0.22
低剂量	31.02 ± 1.43	3.59 ± 0.26
EWP-Ca组 中剂量	31.46 ± 0.96	3.58 ± 0.23
高剂量	31.06 ± 0.97	3.90 ± 0.19** $\Delta\Delta$

由表5可知，各组间大鼠股骨长度均无显著差异。高剂量EWP-Ca组股骨直径明显高于其他任何一组，与缺钙模型组和CaCO₃组相比较，差异均达极显著水平($P < 0.01$)。以上结果表明，EWP-Ca可以增加大鼠股骨直径即股骨中心宽度，并且效果优于钙含量相同的CaCO₃组。

2.3.2 蛋清肽-钙配合物对大鼠股骨干质量、骨钙含量的影响

表6 饲喂蛋清肽-钙配合物对大鼠股骨干质量、骨钙含量的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 6 Effect of EWP-Ca on femoral weight and calcium content of rats
($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	股骨干质量/g	骨钙含量/(mg/g)
普通组	0.28 ± 0.05	163.58 ± 12.93*
缺钙模型组	0.26 ± 0.05	148.93 ± 15.49
CaCO ₃ 组	0.31 ± 0.03**	153.11 ± 7.43
低剂量	0.27 ± 0.05	156.43 ± 12.62
EWP-Ca组 中剂量	0.28 ± 0.03	153.73 ± 9.45
高剂量	0.31 ± 0.03**	167.95 ± 12.09** Δ

由表6可知，缺钙模型组大鼠股骨干质量明显低于其他任何一组；与缺钙模型组相比，高剂量EWP-Ca组和CaCO₃组的股骨干质量均极显著提高($P < 0.01$)；普通组股骨钙含量显著高于缺钙模型组($P < 0.05$)，而高剂量EWP-Ca组股骨钙含量极显著高于缺钙模型组($P < 0.01$)，并且显著高于钙含量相同的CaCO₃组($P < 0.05$)。以上结果表明，高剂量的EWP-Ca的补钙效果优于钙含量相同的CaCO₃。

2.3.3 蛋清肽-钙配合物对大鼠股骨密度的影响

表7 饲喂蛋清肽-钙配合物对大鼠股骨密度的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Table 7 Effect of EWP-Ca on bone mineral density of rats($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	股骨近心端密度	股骨中心端密度	股骨远心端密度
普通组	0.220 ± 0.026**	0.185 ± 0.017**	0.262 ± 0.032**
缺钙模型组	0.169 ± 0.028	0.138 ± 0.020	0.193 ± 0.030
CaCO ₃ 组	0.210 ± 0.014**	0.158 ± 0.056**	0.250 ± 0.025**
低剂量	0.195 ± 0.020*	0.167 ± 0.012**	0.217 ± 0.022*
EWP-Ca组 中剂量	0.207 ± 0.015**	0.173 ± 0.015**	0.227 ± 0.019**
高剂量	0.231 ± 0.032**	0.186 ± 0.013**	0.264 ± 0.020**

由表7可知，与缺钙模型组比较，其余5组股骨

近心端密度均显著提高, 5 组中低剂量 EWP-Ca 组的差异显著($P < 0.05$), 其他 4 组均有极显著差异($P < 0.01$), EWP-Ca 低、中、高剂量组呈现出一定的剂量 - 效应关系。股骨远心端骨密度值变化趋势与近心端相似。比较股骨中心端骨密度值, 普通组、 CaCO_3 组、EWP-Ca 中剂量和高剂量组均极显著高于缺钙模型组($P < 0.01$)。以上结果表明, 中剂量及以上的 EWP-Ca 配合物具有极显著增加大鼠股骨密度的作用。

3 讨 论

已有研究^[11]表明: 大部分骨量(即骨矿含量)的累积发生在儿童和青少年期, 儿童期充足的钙摄入不但可促进儿童的生长发育, 而且对骨的完整性和健康生长非常重要, 可使在青年期达到较高的峰值骨量^[12], 而且对于降低老年期因骨质疏松引起的骨折危险性有着重要作用。因此, 儿童期补钙尤为重要。本实验采用 4 周龄的 Wistar 大鼠作为受试动物, 此时的大鼠正处于青少年增长期, 对钙需要量较大, 也是骨骼成长发育的关键时刻。采用此阶段的大鼠作为实验动物进行补钙研究, 能够模拟对儿童补钙及达到成年后对骨骼发育的影响。人在 20 岁以前主要为骨的生长阶段, 其后的 10 余年骨质仍继续增加, 故在 35~40 岁左右, 单位体积内骨质达到顶峰, 此后, 骨质逐渐丢失, 骨的密度降低到一定程度时, 就不能保持骨骼结构的完整, 甚至压缩变形, 以后在很小外力作用下极可能发生骨折。所以补钙是人类一生中的大问题, 从孕妇到儿童、中年、老年均需不断补充钙质。

目前市场上口服补钙制剂种类繁多, 使广大消费者应接不暇, 不知道何种补钙制剂效果好。我国的膳食组成以植物性食物为主, 含钙量少, 导致钙磷比值严重倒置, 不利于钙的吸收利用, 同时膳食中含有的植酸或草酸易与钙盐结合为不溶性化合物而影响钙的吸收。为此, 实验初步探讨了不同补钙制剂在促进钙吸收作用的效果, 在本实验中, 虽然高剂量 EWP-Ca 组与 CaCO_3 组的钙含量相同, 但由于钙源的吸收度不同, 所以最终表现的钙生物利用率的差别是很大的。结果表明: EWP-Ca 在促进骨骼生长、壮骨作用的效果优于最常用的补钙剂—— CaCO_3 , 是一种优良的补钙制剂。究其原因, 主要是由于骨骼的发育取决于机体对钙的吸收利用以及与其他有机物(如蛋白质)的共同摄入的影响, 而钙的吸收利用受其存在化学形式的影响。机体对钙的吸收主要发生在小肠上部, 通过下列 3 种方式进入细胞内^[13]: 离子钙、非离子扩散钙(分子钙)、钙结合蛋白。在正常人中, 钙结合蛋白对钙的转运能力是一个常量。而单纯依靠钙结合蛋白为细胞内提供钙并不能满足机体需要, 必须设法提高离子钙和分子钙的补钙能力。而离子钙的不足在于在小肠的酸度条件下, Ca^{2+} 易生成不溶物, 导致其吸收率下降。肽 - 钙配合物(又称螯合钙)属

于分子型钙源, 进入体内后, 除少数分解成 Ca^{2+} 外, 其余大部分仍以分子态存在, 并以这种整体的形式被小肠黏膜细胞直接吸收进入血液^[14], 因而受其他物质干扰减少, 金属元素之间的拮抗作用也降低, 故吸收利用率很高。Ashmead 等^[15]认为氨基酸和小肽螯合金属盐可能利用氨基酸和小肽的吸收机制。Du 等^[16]的研究也表明, 小肽螯合铜是利用了肽的吸收机制, 与铁、锌、锰的普通吸收机制不形成竞争。这些研究都证明了这一观点: 氨基酸和肽具有促进金属元素吸收的作用; 氨基酸螯合钙、肽螯合钙的生物利用率很高。

本实验表明了 EWP-Ca 在青少年时期的持续添加, 能够明显提高骨钙含量, 增加股骨密度, 可以作为青少年的良好的钙补充剂。

4 结 论

与缺钙模型鼠相比, 高剂量的 EWP-Ca (其中 Ca 剂量为 $106.4\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$) 能极显著增加大鼠股骨干质量、股骨直径、骨钙含量和骨密度($P < 0.01$), 极显著降低血清 AKP 活力($P < 0.01$); 与钙含量相同的 CaCO_3 组相比, 灌胃高剂量 EWP-Ca, 能使大鼠股骨直径、骨钙含量极显著和显著增加($P < 0.01$, $P < 0.05$), 血清 AKP 活力极显著降低($P < 0.01$)。根据《保健食品功能学评价程序和检验方法》标准, 该产品在促进骨骼生长发育方面具有一定的作用, 且效果优于钙含量相同的 CaCO_3 。

参考文献:

- [1] 杨万根. 蛋清蛋白水解物的制备、结构及其生物活性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [2] 迟玉杰. 蛋白质水解物的研究与开发[J]. 中国食物与营养, 2003(8): 20-23.
- [3] 萧家捷. 缺钙与补钙[J]. 中国食品营养, 1997(2): 32-33.
- [4] 乔伟, 周安国, 王之盛, 等. 小肽促进微量元素吸收的研究进展[J]. 饲料工业, 2006, 27(17): 12-14.
- [5] CHOI I, JUNG C, CHOI H, et al. Effectiveness of phosphopeptides on enhancing bioavailability of calcium and its accumulation in bones[J]. Food Chemistry, 2005, 93(4): 577-583.
- [6] 菅景颖. 胶原多肽螯合钙的制备及其壮骨、骨质疏松防治作用研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2007.
- [7] 韩樱, 何慧, 马芝丽, 等. 蛋清肽及肽钙配合物的制备[J]. 食品科学, 2011, 32(6): 110-114.
- [8] 徐彩娜. 卵黄高磷蛋白磷酸肽的酶解制备及其持钙功能特性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2009.
- [9] 谢笔钧, 何慧. 食品分析[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [10] 刘忠厚. 骨质疏松学[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [11] BONJOUR J P, CARRIE A L, FERRARI S, et al. Calcium-enriched foods and bone mass growth in prepubertal girls: a randomized, double blind, placebo controlled trial[J]. ClinInvest, 1997, 99(6): 1287-1294.
- [12] JOHNSTON C C, Jr, MILIER J Z, SLEMENDA C W, et al. Calcium supplementation and increases in bone mineral density in children[J]. N Engl J Med, 1992, 327(2): 82-87.
- [13] 郑理, 袁亦丞. 合理补钙及正确选择钙源[J]. 食品工业, 1998(1): 38.
- [14] 高宪枫, 郑建仙. 论钙的营养与强化[J]. 食品与发酵工业, 1999, 25(4): 48-52.
- [15] ASHMEAD H. The roles of amino acid chelates in animal nutrition[M]. USA: William Andrew Publishing, 1993.
- [16] DU Z, HEMKEN R W, JACKSON J A, et al. Utilization of copper in copper proteinate, copper lysine, and cupric sulfate using the rat as an experimental model[J]. J Anim Sci, 1996, 74(7): 1657-1663.