

文章编号: 1001-7453(1999)02-0055-05

鸡蛋中卵黄高磷蛋白的提取

倪 莉, 王 璋, 许时婴

(无锡轻工大学食品学院, 江苏无锡 214036)

摘要: 建立了一种简单且适合于批量提取鸡蛋中的卵黄高磷蛋白的方法. 先分离出其它水溶性蛋白质, 再将沉淀物脱去脂肪, 然后用 10% 的 NaCl 溶液 (pH7.0) 从所得的颗粒中提取卵黄高磷蛋白. 每 100 g 蛋黄提取 1 g 卵黄高磷蛋白粗制品, 含氮 11.22%, 含磷 7.7%, 氮磷含量比值 3.64. 卵黄高磷蛋白在 Sephacryl S-200 图谱上有两个主峰, 分别是 α -PV 和 β -PV, 相对分子质量为 160 000 和 190 000. 在聚丙烯酰胺凝胶电泳上出现相对应的两条谱带. 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 则出现相对分子质量从 $10^4 \sim 9 \times 10^5$ 左右的多条谱带, 预示卵黄高磷蛋白是由多亚基组成的.

关键词: 鸡蛋; 卵黄高磷蛋白; 提取

中图分类号: Q513.3 文献标识码: A

卵黄高磷蛋白 (Phosvitin, 简称 PV) 是已知的所有蛋白质中磷酸化程度最高的一种, 在溶液中表现出与酸性多肽同样的特性, 即易与各种阳离子相结合, 已被确认的有 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Sr^{2+} 等^[1]. 它与铁离子的结合力非常强, 超过了柠檬酸、次氨基三乙酸与铁的螯合作用, 甚至超过了铁传递蛋白^[2]. 卵黄高磷蛋白与阳离子的强烈结合, 使之在蛋及其它制品中可作为有效的抗氧化剂^[3]. 卵黄高磷蛋白还具有较好的乳化性^[4]、热稳定性^[5], 而且兼具安全、营养等优越性. 作为磷酸丝氨酸残基资源库的卵黄高磷蛋白, 其本身或水解产物都有可能作为很好的钙强化的辅助剂, 对于提高 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 等离子的生物利用率也可能有较大作用^[2]. 因此, 卵黄高磷蛋白具有较好的应用前景. 然而, 已有的分离卵黄高磷蛋白的方法^[6-9]仅限于实验室规模, 耗时太长, 脱脂时使用的溶剂为非食品级, 其它蛋白质无法进一步使用, 而且卵黄高磷蛋白的回收率低. 日本的若松利男报道了适于工业化制备的方法^[10], 但该方法中硫酸铵使用量大, 易造成一定污染. 本文基于 J. N. Lusso 和 S. Nakai 的方法^[11], 建立了一种更为简单的、适于批量从鸡蛋蛋黄中分离出食品级的卵黄高磷蛋白的工艺, 并综合考虑了蛋黄中其它组分的利用.

1 材料和方法

1.1 材料

新鲜鸡蛋购自无锡马山地区, 一周内使用. 商品卵黄高磷蛋白购自 Sigma 公司 (美国). 除 95% 酒精和工业己烷外其它试剂均为分析纯.

收稿日期: 1998-11-06; 修订日期: 1999-03-19

作者简介: 倪 莉 (1972 年 10 月生), 女, 福建龙岩人, 博士研究生.

1.2 方法

1.2.1 卵黄高磷蛋白的分离 图 1 是卵黄高磷蛋白提取工艺的简图.

蛋黄置于滤纸上除去附着的蛋清,用针挑破膜,收集蛋黄的内容物.蛋黄内容物用预冷至 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 的水稀释 10 倍,搅拌 30 min 后,在 4°C 下过夜保存.上清液含有除卵黄高磷蛋白外的所有可溶性蛋白质,可用于分离卵黄球蛋白 (IGY)^[12].沉淀物用食用酒精、工业己烷浸提脱脂,滤液经旋转蒸发仪除去有机溶剂后可分离出蛋黄的脂质.脱脂蛋黄粉风干后用 10 倍体积 10% 的 NaCl 溶液 (pH7.0) 提取,提取液经中空纤维超滤脱盐,冷冻干燥后即得卵黄高磷蛋白的粗制品.

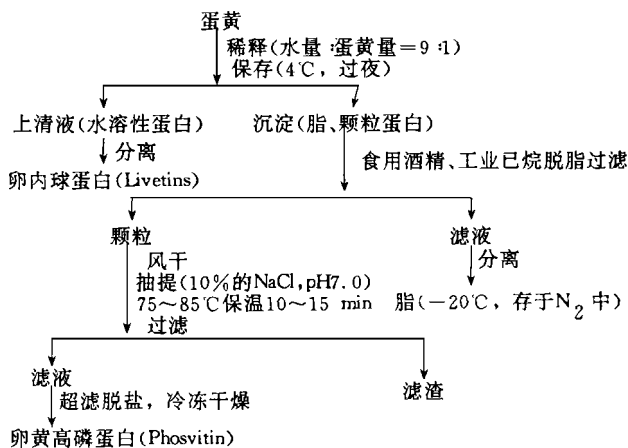


图 1 卵黄高磷蛋白的提取分离流程

1.2.2 氮和磷的测定 微量凯氏定氮法测定氮含量^[13],磷含量的测定参考 Morrison 法^[14].

1.2.3 凝胶过滤色谱

凝胶材料: 交联丙烯基葡聚糖凝胶 Sephacryl S-200

流速: 20 ml/h

洗脱液: 0.1 mol/L pH7.0 的磷酸缓冲溶液

色谱柱规格: 1.6 cm \times 150 cm

检测仪器: 8802UV 检测器 (浙江温州孚华分析仪器厂制造)

检测波长: 220 nm

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳

电泳装置: BS423型稳压稳流电泳仪 北京生化公司制;垂直板电泳槽 上海申华生化公司制.

电泳条件: 浓缩胶—— T 4%, C 3%, 0.125 mol/L Tris-HCl (pH6.8) 的缓冲溶液;分离胶—— T 10%, C 3%, 0.375 mol/L Tris-HCl (pH8.8) 的缓冲溶液;电极缓冲溶液—— 0.025 mol/L Tris 和 0.192 mol/L Glycine 的缓冲溶液;恒流 10 mA.

染色: 先置于 45% 的甲醇、10% 的醋酸固定液中 8 h, 移入 50% 的甲醇溶液 1 h 后, 再置于 Stains-all 溶液 (20 mg Stains-all 溶于 10 mL 甲酰胺溶液, 再加 50 mL 异丙醇和 1 mL pH8.8 浓度 3 mol/L 的 Tris-HCl 溶液, 用去离子水定容至 200 mL), 于避光处染色过夜.

脱色液: 水 (在避光处脱色).

1.2.5 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

电泳条件: 浓缩胶—— T 4%, C 3%, 0.1% 的 SDS, 0.125 mol/L Tris-HCl (pH6.8) 缓冲溶液;分离胶—— T 10%, C 3%, 0.1% 的 SDS, 0.375 mol/L Tris-HCl (pH8.8) 缓冲溶液;电极缓冲溶液—— 0.1% 的 SDS, 0.025 mol/L Tris 和 0.192 mol/L Glycine 的缓冲溶液;恒流 10 mA.

染色: 直接在 0.2% 的考马斯亮蓝 G-250 45% 的乙醇和 10% 的醋酸染色液中染色 1 h。
 脱色液: 0.5 mol/L NaCl 溶液。

标准蛋白质及其相对分子质量: 磷酸化酶 94 000, 白蛋白 67 000, 卵清蛋白 43 000, 碳酸酐酶 30 000, 胰蛋白酶抑制剂 20 100, α 乳清蛋白 14 400。

2 结 果

2.1 氮、磷含量及氮磷比值

卵黄高磷蛋白的氨基酸组成中, 芳香族氨基酸含量很低, 在 280 nm 处的吸光值弱, 因而测氮含量的最佳方法是凯氏定氮法。氮磷含量比值通常被用来衡量含磷蛋白质纯度的高低, 氮磷含量比值越低, 纯度越高。由表 1 可知, 本研究所得的卵黄高磷蛋白氮磷含量比值较低, 纯度应较高。但含氮和含磷绝对量较低, 这很可能是超滤脱盐未彻底, 使得产品中的灰分较高所造成的。

表 1 不同制备方法所得卵黄高磷蛋白的得率及其氮、磷含量和氮磷含量比值

样品	氮质量分数 / %	磷质量分数 / %	氮磷含量比值	得率 / (mg / egg)
Sigma	10.12	9.00	2.49	未知
Yamamoto	14.60	8.74	3.70	50~70
Losso	15.20	9.34	3.60	100~113
本研究粗制品	11.22	7.7	3.23	130

2.2 凝胶过滤色谱

见图 2~4。

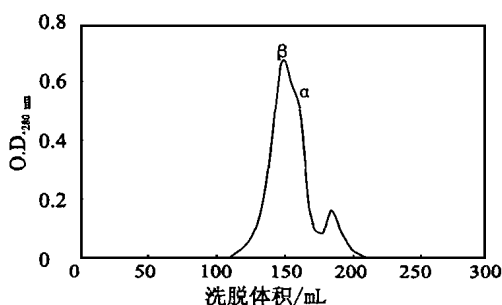
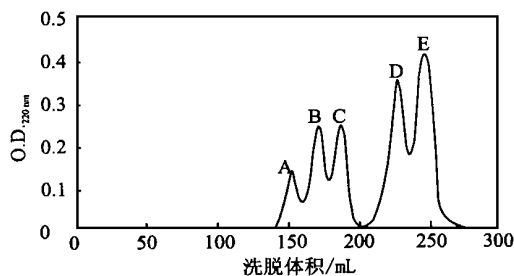


图 2 本工艺流程提取的卵黄高磷蛋白粗制品的凝胶过滤洗脱曲线

从凝胶过滤图谱中可以看出, 以本方法分离出的卵黄高磷蛋白粗制品有 2 个主峰—— β -PV 和 α -PV, 相对分子质量分别为 190 000 和 160 000。与 SIGMA 公司的卵黄高磷蛋白的洗脱图谱相比较, 粗制品中还含有少量相对分子质量在 45 000 左右的杂蛋白, 这很可能是蛋黄中的其它水溶性蛋白。

2.3 电泳

见图 5, 卵黄高磷蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳谱图上出现了 2 条主要谱带, 即与凝胶过



A: 二磷酸果糖酶 (Aldolase), 相对分子质量 158 000
 B: 牛血清蛋白 (albumin), 相对分子质量 68 000
 C: 鸡蛋白蛋白 (albumin), 相对分子质量 45 000
 D: 胰凝乳蛋白酶原 (Chymotrypsinogen A), 相对分子质量 25 000
 E: 细胞色素 C (Cytochrome C), 相对分子质量 125 000

图 3 标准蛋白质的凝胶过滤洗脱曲线

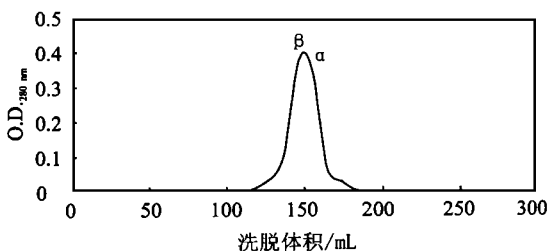
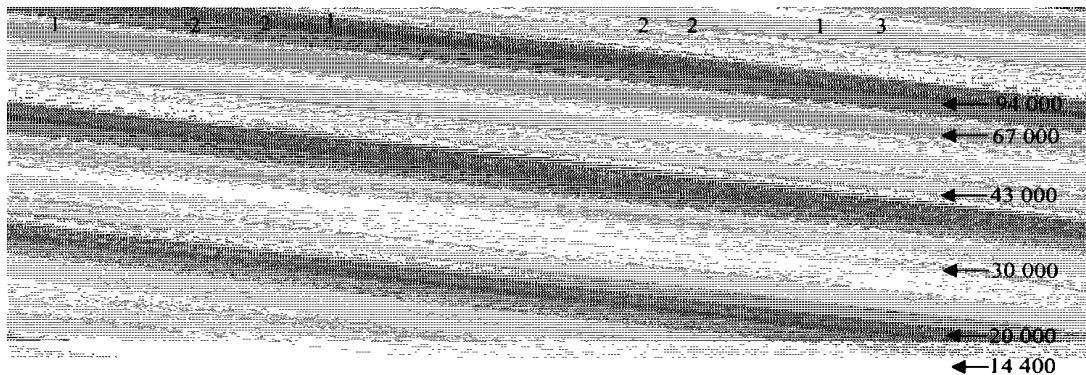


图 4 SIGMA 公司卵黄高磷蛋白的凝胶过滤洗脱曲线

滤谱图上的 2 个主峰相对应的 α -PV 和 β -PV. 在 SDS-PAGE 上则出现多条谱带, 相对分子质量从 $10^4 \sim 9 \times 10^4$, 主要的一条谱带在 35 000 左右, 见图 6. 由此可见卵黄高磷蛋白是由多亚基组成的.



1. SIGMA 公司样品
2. 本工艺流程提取的卵黄高磷蛋白粗制品

图 5 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

1. SIGMA 公司样品
2. 本工艺流程提取的卵黄高磷蛋白粗制品
3. 标准蛋白

图 6 SDS-PAGE 图谱

3 讨 论

本工艺流程首先分离出的水溶性蛋白质可以用于生理活性物质免疫球蛋白的提取. 脱脂时采用的是食品级的溶剂, 分离出的脂质可以用于食品中.

在蛋黄中卵黄高磷蛋白与脂蛋白-卵磷脂蛋白形成复合体, 乙醇的作用是使脂质与蛋白质分离, 并使卵黄磷蛋白变性, 从而释放出水溶性的卵黄高磷蛋白. 用己烷提取脂质, 脂肪的抽提率高, 并节省了溶剂用量. 水溶性的卵黄高磷蛋白可以直接用盐溶液进行提取. 但是由于分离出水溶性蛋白质后的沉淀浆料以及 95% 的乙醇中仍含有少量水分, 致使部分卵黄高磷蛋白溶于水而造成一定的损失.

卵黄高磷蛋白的氯化钠抽提液中还含有其他盐溶的杂蛋白, 经 $75 \sim 85^\circ\text{C}$ 保温, 大部分的杂蛋白变性沉淀, 而卵黄高磷蛋白的热稳定性很好, 在 pH 值 $4 \sim 8$, 100°C 下加热数小时, 卵黄高磷蛋白不产生沉淀, 亦没有发生其它明显变化^[5]. 再经过滤处理则大大地减少了因盐浓度的降低杂蛋白产生沉淀而对中空纤维膜产生的污染.

卵黄高磷蛋白的纯度仍是一个较为复杂的问题, 采用不同分离和检测方法, 卵黄高磷蛋白的组分存在一定的差异, 这意味着卵黄高磷蛋白结构的复杂性.

本工艺流程提取卵黄高磷蛋白具有简单、安全、批量生产的特点, 而且综合利用了蛋黄中的其他组分.

参考文献:

- [1] 高真主编. 蛋制品工艺学 [M]. 北京: 中国商业出版社, 1992
- [2] GEORGE TABORSKY. PHOSVITIN Adv [J]. *Inorg Biochem.* 1983, 5 235~ 279
- [3] LU Chong-Liang, ROBERT C BARKET. Effect of pH and food ingredients on stability of egg yolk phospholipids and the metal chelator antioxidant activity of phosvitin [J]. *J Food S.* 1987, 52(3): 613 ~ 616
- [4] SIEW LIAN CHUNG, LESK FERRIER. Conditions affecting emulsifying properties of egg yolk

- phosvitin[J]. *J Food S*, 1991, 56(5): 1259~ 1262
- [5] TAKATOSHI ITO H, YU TAKA ABE, SU SUMU ADACHI. Comparative studies on the α and β -phosvitin from hen's egg yolk[J]. *J Food S*, 1983, 48 1755~ 1757
- [6] DALE K MECHAM, HAROLD S OLCOTT. Phosvitin the principal phosphoprotein of egg yolk[J]. *American Chemical Society*, 1949, 71 3670~ 3679
- [7] JOUBERT J, COO K W H. Preparation and characterization of phosvitin from hen egg yolk[J]. *Can J Biochem Physiol*, 1985, 36 399~ 408
- [8] SUNDARARAJAN A, SAMPATH KUMAR K S V, SARMA P S. A simplified procedure for the preparation of phosvitin and vitellin[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1960, 38 360~ 362
- [9] WALLACE R A, JARED D W, EISEN A Z. A general method for the isolation and purification of phosvitin from vertebrate eggs[J]. *Can J Biochem*. 1966, 44 1647~ 1655
- [10] 若松利男, 押田一夫, 山浦淑子. 卵黄高磷蛋白的提取方法 [P]. 日本专利: JP Kokai Tokkyo Koho JP 平 3-56500, 1991-03-12.
- [11] LOSSO J N, NAKAI S. A simple procedure for isolation of phosvitin from chicken egg. *Egg Uses Process Technol*, 1994. 150~ 157
- [12] 杨严峻. 免疫活性蛋白——鸡蛋免疫球蛋白和乳铁蛋白的研究与开发 [D]. 无锡: 无锡轻工大学, 1997.
- [13] 黄伟坤编著. 食品检验与分析 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1989. 226~ 227
- [14] MORRISON W R. A fast, simple and reliable method for the microdetermination of phosphorus in biological materials [J]. *Anal Biochem*, 1964, 7 218-224

Preparation of Phosvitin from Egg Yolk

NI Li, WANG Zhang, XU Shi-ying

(School of Food Science & Technology, Wuxi University of Light Industry, Jiangsu Wuxi 214036)

Abstract A simple method suitable to prepare phosvitin from egg yolk on a pilot plant scale was developed, which consisted of the removal of water-soluble proteins, except phosvitin, the removal of lipids, the isolation of phosvitin from the resulted granules with 10% NaCl (pH7.0), and desalting by using ultrafiltration. A yield of 1g crude phosvitin per 100g egg yolk was obtained with N/P ratio of 3.64. Crude phosvitin was fractionated into mainly two components (α -PV and β -PV) by Sephacryl S-200 gel filtration, with molecular weight of 160 000 Da and 190 000 Da respectively. Polyacrylamide gel electrophoresis of native phosvitin revealed the presence of similar polypeptide subunits. Phosvitin was dissociated into several bands, ranging in molecular weight from 10 000 to 90 000 daltons in the SDS polyacrylamide-gel electrophogram.

Key words egg yolk; phosvitin; preparation