

文章编号 :1009-038X(2000)04-0325-06

卵黄高磷蛋白磷酸肽的制备及钙结合性质研究^①

江波¹, Y. Mine²

(1. 无锡轻工大学食品学院, 江苏无锡 214036; 2. 圭尔夫大学食品科学系, Canada, N1G 2W1)

摘 要 :以卵黄高磷蛋白质为原料,经碱法脱磷、胰蛋白酶水解后分离制备得到一种新型的卵黄高磷蛋白磷酸肽(PPP)。卵黄高磷蛋白质经 0.1、0.2、0.3、0.4 mol/L NaOH 处理 3 h,脱磷率分别为 34.6%、81.6%、92.5%、96.3%。SDS-PAGE 电泳结果显示,脱磷卵黄高磷蛋白质经胰蛋白酶水解后,产物为小分子肽。经 BaCl₂ 法和超滤法分离得到的磷酸肽的平均氨基酸残基数分别为 10 个与 20 个。对 PPP 的钙结合能力进行了研究并同商品化酪蛋白磷酸肽(CPP)进行了比较。PPP 能有效地与钙络合,因而它在功能食品中有着较好的应用前景。

关键词 :卵黄高磷蛋白质;磷酸肽;蛋黄;功能因子;钙吸收促进剂

中图分类号 :Q629.72

文献标识码 :A

Preparation and Their Calcium Binding Properties of Novel Functional Oligo-phosphopeptides from Egg Yolk Phosvitin

JIANG Bo¹, Y. Mine²

(1. School of Food Science and Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036; 2. Department of Food Science, University of Guelph, Canada, N1G 2W1)

Abstract :Novel phosvitin phosphopeptides(PPP) were prepared by tryptic hydrolysis following alkaline dephosphorylation of hen egg yolk phosvitin. Phosvitin dephosphorylation by alkaline attained 34.6%, 81.6%, 92.5%, and 96.3% yield after incubation with 0.1, 0.2, 0.3, and 0.4 mol/L NaOH for 3 h respectively. The SDS-PAGE of tryptic hydrolysates of phosvitin showed that one fraction of small peptides was obtained, and the average amino acid chain length of phosphopeptides isolated by BaCl₂ precipitation and ultrafiltration were 10 and 20 respectively. Calcium binding properties of PPP were compared with those of commercial casein phosphopeptides(CPP). It was verified that PPP effectively enhanced the calcium binding capacity and inhibited the formation of insoluble calcium phosphates. At pH 7.8 and 22 °C, 36.3 mg/L of Ca solubility was obtained at the concentration of 200 mg/L of PPP, which may have potential applications of this calcium enhancer in nutraceuticals.

Key words :phosvitin; phosphopeptides; egg yolk; nutraceuticals; calcium enhancer

在鸡蛋蛋黄中,卵黄高磷蛋白质是一种主要的含磷蛋白质。其相对分子质量为 35 000,含有 10%

① 收稿日期:1999-12-13,修订日期:2000-03-17。
作者简介:江波(1962-),男,江苏无锡人,工学博士,副教授。

的磷及 3.5% 的碳水化合物。卵黄高磷蛋白质一词意为其含有较高的磷且来自于蛋黄^[1]。它由 217 个氨基酸残基组成,其中 123 个为丝氨酸残基,占该蛋白质总氨基酸的 56.7%^[2]。几乎所有的丝氨酸残基都与磷酸基团结合,在多组分金属元素体系中,它们起着金属螯合剂的作用^[3]。

早期的实验证实,含磷蛋白质对蛋白酶有拮抗作用,不易被蛋白酶所水解,胰蛋白酶和胃蛋白酶对它的水解程度不如无磷或低磷蛋白质大^[1]。Goulas 等^[4]报道用胰蛋白酶水解卵黄高磷蛋白质,得到的一个肽链片断(Gln 49~Arg 212)较大,说明该蛋白质的核心部位仍不能被蛋白酶作用。其原因或许是由于磷酸基团上的负电荷使得相邻肽键很难被酶作用。

另一方面,鸡蛋中 95% 的铁存在于蛋黄中,并与卵黄高磷蛋白质相结合,但其相对生物学效价则很低,仅为 FeSO₄ 的 30%^[5]。Taborsky^[6]的研究表明,铁与该蛋白质结合后,使得蛋白质难于形成适宜被水解的 β 构象。该项研究的意义在于说明了卵黄高磷蛋白质有着非常稳定的构象,铁一旦与它结合就不易解离^[7]。由于该蛋白质既不易被蛋白酶作用,与铁结合后其效价又很低,所以通常认为卵黄高磷蛋白质在营养学上是不利的。而与此相反,酪蛋白质经水解后得到的磷酸肽,即酪蛋白磷酸肽(CPP),则能增加小肠对钙的吸收及其在体内的蓄积。这种由磷酸肽诱导的钙代谢并不需要维生素 D^[8,9]。此外,这些生物活性肽还能与其它微量元素如铁、铜及硒等形成磷酸盐络合物,其在功能食品中已得到广泛的应用^[10,11]。现已证实,能与钙形成可溶性络合物的主要功能团是磷酸酰丝氨酸^[9,12]。然而,肽链中磷酸酰丝氨酸的数量及肽链长度与钙络合能力之间的关系仍未研究透彻。

作者的研究目的是开发出一种从卵黄高磷蛋白质制备磷酸肽的方法,并研究其结合钙能力,使其成为一种新的增进钙吸收的功能因子。

1 材料与方法

1.1 材料

胰蛋白酶(E.C. 3.4.21.4, 1.1×10⁷ IU/g),胰凝乳蛋白酶(E.C. 3.4.21.1, 4.2×10⁴ IU/g),胃蛋白酶(E.C. 3.4.23.1, 3.9×10⁶ IU/g),酸性磷酸酶(E.C. 3.1.3.2, 1.1×10³ IU/g),2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS, 5%)以及卵黄高磷蛋白质均购自 Sigma 公司(St. Louis, MO)。新鲜鸡蛋来自圭尔夫大学(University of

Guelph)Arkell 养鸡场。由于实验需要,较大量卵黄高磷蛋白质由作者自蛋黄中分离制备获得。CPP II 由明治公司(日本东京)惠赠。除非另述,其它所用试剂级别均为分析纯以上(美国化学会 ACS 标准)。

1.2 卵黄高磷蛋白质制备

卵黄高磷蛋白制备按 Losso 及 Nakai^[13]所报道的方法稍作改进后进行。12 个蛋黄分散于 1 L 冷水中,于 4℃ 下搅拌 6 h。收集得到的沉淀于 70 000 g 及 15℃ 条件下离心 60 min。收集沉淀并分散于 400 mL 0.05 mol/L 的 NaCl 中,搅拌 4 h,然后将上述悬浮体系再次以 110 000 g 及 15℃ 条件下离心 30 min。沉淀中油脂部分经 400 mL 混合溶剂(V_{正乙烷}:V_{乙醇} = 3:1),在 4℃ 萃取 6 h 除去,然后经滤纸过滤。所得滤饼用 200 mL 1.74 mol/L 的 NaCl 萃取,溶解的蛋白质经透析、冷冻干燥得到卵黄高磷蛋白质固体。

1.3 卵黄高磷蛋白质的酶解方法

取冻干卵黄高磷蛋白质 200 mg,将其分散于 6 mL 超净水中,然后用氢氧化钠或盐酸将上述溶液调节至 pH 值为 8.0(胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶试验组)或 2.5(胃蛋白酶试验组)^[4]。酶解反应在 37℃ 下反应至 24 h,适时滴加 0.25 mol/L NaOH 以保持 pH 值基本恒定。W_{起始酶}:W_{底物} = 1:50,最后调节 pH 值至 5.0 中止酶反应。

在以碱法脱磷的卵黄高磷蛋白质为原料进行酶解时,蛋白质质量浓度为 25 mg/L,其它条件同上。

1.4 卵黄高磷蛋白质酶法脱磷

将 80 mg 卵黄高磷蛋白质及 1 mg 酸性磷酸酶分散于 1 mL 0.05 mol/L pH 4.8 的醋酸缓冲液中,于 37℃ 下反应 8 h。调节 pH 至 7.0 中止酶反应。

1.5 卵黄高磷蛋白质碱法脱磷

各取 50 mg 卵黄高磷蛋白质分别溶于 2 mL 0.1,0.2,0.3,0.4 mol/L 的 NaOH 中,37℃ 下反应至 3 h 或指定时间,迅速用盐酸将 pH 值调节至 7.0。若该脱磷蛋白质直接用于胰蛋白酶水解,可将 pH 值调节至 8.0。

1.6 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

SDS-PAGE 按 Hegenauer 等^[14]报道的方法进行。凝胶质量浓度为 12.5 g/dL,电泳后用改进的考马斯染色法(适用于含磷蛋白质),再用普通考马斯染色法染色。染色凝胶经混合溶剂(V_{醋酸}:V_{甲醇}:V_水 = 1:8:12),脱色 4 h 后,用扫描仪记录图谱。

1.7 磷质量分数的测定

碱法脱磷的卵黄高磷蛋白质经充填有 Sephadex G-25 M 的 PD-10 柱脱去磷酸盐 ,收集起始 5.5 mL 洗脱液 . 磷含量按 Bartlett^[15]所报道的方法测定 ,以未经碱处理的卵黄高磷蛋白质经 PD-10 处理后的洗脱液作对照样 .

脱磷率 =

$$\frac{\text{对照组中的磷含量} - \text{经碱处理后洗脱液磷含量}}{\text{对照组中的磷含量}}$$

1.8 磷酸肽的制备

脱磷卵黄高磷蛋白质经胰蛋白酶水解后 ,按 Manson 及 Annar^[16]报道的方法制备磷酸肽 . 酶水解液在 5 900 g ,10 ℃ 条件下离心 15 min . 在上清液中加入 10% BaCl₂ 溶液至 BaCl₂ 终质量分数为 0.25% ,接着加入等体积的无水乙醇 . 再次按上述条件离心 ,沉淀用 5 mL 含有 60 mg EDTA 的溶液溶解 ,然后冷冻干燥 .

用于钙结合试验的磷酸肽按下述方法制备 . 部分脱磷的卵黄高磷蛋白质经胰蛋白酶水解后 ,按前述方法离心 . 上清液先经 0.45 μm 微孔膜过滤 ,然后用相对分子质量为 1 000 的 Diafo 超滤膜超滤 ,收集截留液并冷冻干燥 .

1.9 氨基酸分析

样品经 200 μL 5.7 mol/L 的 HCl 于 105 ℃ 下真空水解 24 h ,然后用 Beckman System Gold Amino Acid Analyzer 系统测定样品中各氨基酸含量 .

1.10 三硝基苯磺酸法 (TNBS) 测定游离氨基含量

磷酸肽中游离伯氨基测定按 Fields^[17]所报道的方法进行 ,并作以下修改 . 取适量样品 ,加入 0.5 mL 0.2 mol/L pH 8.2 的磷酸缓冲液 ,加水至体积为 1 mL . 接着 ,加入 1 mL 0.1% 的 TNBS 溶液并迅速混匀 . 于 40 ℃ 下反应 2 h ,加入 2.0 mL 含有 1.5 mmol/L 亚硫酸盐之 0.1 mol/L NaH₂PO₄ 溶液以中止反应 ,于 420 nm 波长处测定吸光度 ,以不含样品之空白液作对照组 . 称取 3~15 μg 赖氨酸盐酸盐 ,按上述方法反应 ,用于作标准曲线 .

1.11 钙结合试验

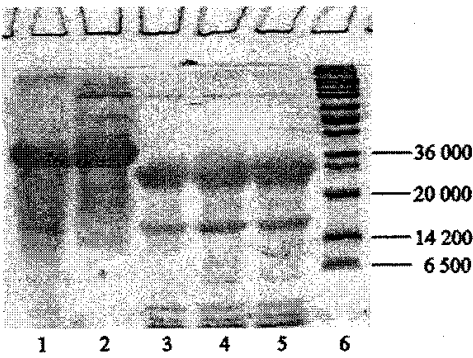
钙测定按 Sato 等^[18]报道的方法进行 ,并作以下修改 . 称取适量已预先经 Chelex - 100 树脂脱盐的磷酸肽固体样品 ,分别添加于 5 mmol/L CaCl₂ 及 20 mmol/L pH 8.0 的磷酸缓冲液 ,22 ℃ 下搅拌 30 min ,滴加 0.05 mol/L NaOH 将反应体系之 pH 保持在 7.80 . 取少量悬浮液经 0.45 μm 微孔膜过滤 ,在每 1 mL 滤清液中加入 1 mL 3% KCl 溶液并稀释至 10 mL ,由 Varian SpectrAA-300 型原子吸收光谱

测定钙含量 .

2 结果与讨论

2.1 卵黄高磷蛋白质酶解试验

将卵黄高磷蛋白分别经胃蛋白酶、胰蛋白酶及胰凝乳蛋白酶处理 ,胰蛋白酶解液的 SDS-PAGE 结果如图 1 所示 .



1) 原始卵黄高磷蛋白质 (Sigma 产品) ; 2) 原始卵黄高磷蛋白质 (作者制备) ; 3, 4, 5) 卵黄高磷蛋白质经胰蛋白酶分别水解 1, 5, 24 h ; 6) 标准蛋白质

图 1 卵黄高磷蛋白质胰蛋白酶水解产物的电泳结果
Fig.1 SDS-PAGE pattern of trypsin-digested phosvitin

卵黄高磷蛋白质被胰蛋白酶裂解为 2 个较大肽链及 3 个较小的片段 . 相对分子质量为 28 000 之大肽链可能就是 Goulas 等^[4]所报道的 Gln 49~Arg 212、一个长度为 164 个氨基酸残基的肽链 . 胰蛋白酶很难继续将该肽链水解为较小片段 . 利用胰凝乳蛋白酶及胃蛋白酶水解该蛋白质得到类似的结果 . 此外 , 还将先经磷酸酶部分脱磷的卵黄高磷蛋白作底物进行酶解试验 , 也未得到小分子肽 . 其原因可能是卵黄高磷蛋白质中高度磷酸化的殊结构阻碍了蛋白酶的作用 .

2.2 卵黄高磷蛋白质碱法脱磷

卵黄高磷蛋白质的碱法脱磷结果见图 2 . 在起始 2 h 内 , 脱磷速度非常快 , 此后 , 速度趋缓 . 卵黄高磷蛋白质经 0.1, 0.3 mol/L NaOH 处理 2 h 后 , 分别脱去 31% 及 88% 的磷酸基团 . 在试验过程中 , 由于失去磷酸基团 , 可观察到卵黄高磷蛋白质的溶解度逐渐降低 . 氢氧化钠对卵黄高磷蛋白质的进一步试验 . 结果表明 , 在 37 ℃ 下处理 3 h , 经 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mol/L NaOH 处理 , 卵黄高磷蛋白质分别脱去 34.6% , 81.6% , 92.5% , 96.3% 的磷酸基 . 图 2 与图 3 结果说明 , 脱磷率与碱的浓度及脱磷时间有关 . 基于以上结果 , 可以有控制地制备所需磷酸基含量的卵黄高磷蛋白质 .

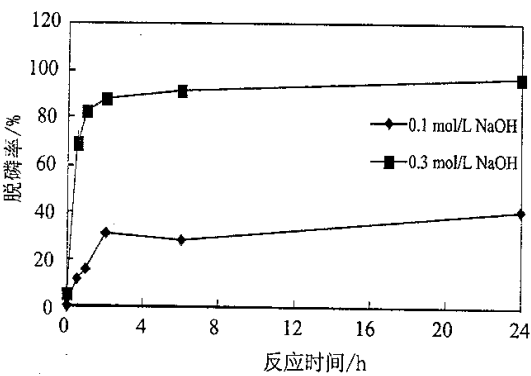
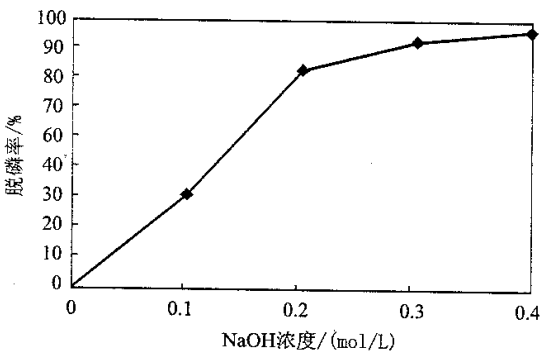


图 2 0.1 及 0.3 mol/L NaOH 处理卵黄高磷蛋白质时,反应时间对脱磷率的影响

Fig.2 Time course of dephosphorylation of phosvitin with 0.1 and 0.3 mol/L NaOH.



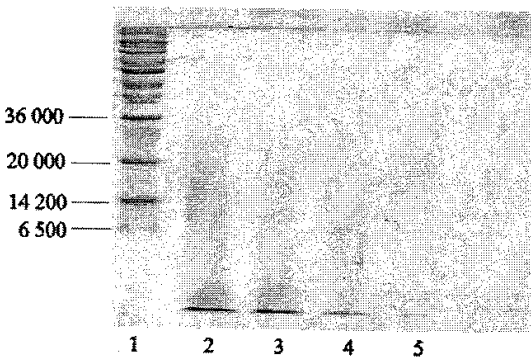
反应条件 37℃处理 3 h

图 3 NaOH 浓度对卵黄高磷蛋白质脱磷率的影响

Fig.3 Relationship between the degree of dephosphorylation and concentration of NaOH.

2.3 脱磷卵黄高磷蛋白质的胰蛋白酶水解

经 3 h 脱磷后再经 4 h 胰蛋白酶处理所得到的水解液的电泳结果见图 4.



1) 标准蛋白质; 2, 3, 4 及 5) 分别用 0.1, 0.2, 0.3 及 0.4 mol/L NaOH 处理卵黄高磷蛋白 4 h, 然后再经胰蛋白酶水解后产物

图 4 脱磷卵黄高磷蛋白质的胰蛋白酶水解产物的电泳结果

Fig.4 SDS-PAGE pattern of tryptic digestion of alkaline dephosphorylated phosvitin

与图 1 结果不同的是,只在分离胶的底部发现一条蛋白(肽链)带,故可估计出该条肽链的相对分子质量应不大于 4 000. 已知在卵黄高磷蛋白质的 123 个丝氨酸中,80 个位于核心部位(第 56~154 个残基),多达 14 个相连丝氨酸残基分散于碱性氨基酸精氨酸、赖氨酸或天门冬氨酸之间^[21]. 由此可见,在碱法脱磷过程中,卵黄高磷蛋白质原先不易被蛋白酶作用的核心部位,在碱的作用下,结构发生了变化,一些易受酶作用的肽键暴露在表面.

2.4 卵黄高磷磷酸肽氨基酸残基数的测定

据前述方法制得 2 种磷酸肽. 一种是将 10% BaCl₂ 加入卵黄高磷蛋白质的胰蛋白酶水解液中沉淀得到,该样品仅用于氨基酸分析及总氨基测定. 由于含有钡离子,不将其用于钙结合试验. 另一种样品是将卵黄高磷蛋白质的胰蛋白酶水解液通过相对分子质量为 1 000 的超滤膜,除去磷酸盐、金属离子、氨基酸及小分子片段,收集截留液.

PPP 中的总游离伯胺基含量用三硝基苯磺酸(TNBS)方法测定,该方法利用伯胺与 TNBS 形成有色物质,然后由分光光度法测定吸光值. 总赖氨酸含量用氨基酸自动分析仪测得. 由于一个赖氨酸含两个伯胺基,因而 PPP 的残基数由下法求出:

$$\text{PPP 的平均残基数} = \frac{M_{aa}}{(M_{pa} - M_1)}$$

上式中, M_{aa} ($\mu\text{mol/g}$) 为样品中总氨基酸含量; M_{pa} ($\mu\text{mol/g}$) 为样品总游离伯氨基含量; M_1 ($\mu\text{mol/g}$) 为样品中总赖氨酸含量.

值得注意的是,尽管通常认为吸光度与 α -氨基质量分数的线性关系良好,但对于不同蛋白质而言,标准曲线的截距与斜率仍有较大偏差^[20].

表 1 结果显示,用超滤法所得的肽较用氯化钡沉淀法所得的肽链为长,前者平均残基数为 17~20,而后者仅为 9.6~11.8.

表 1 胰蛋白酶解液中磷酸肽的平均氨基酸残基数

Tab.1 Average Chain Length of Phosphopeptides from Tryptic Hydrolysates

样品	PPR(Ⅱ)	PPR(Ⅲ)	PPR(1)	PPR(2)
平均链长	20.0	17.1	9.6	11.8

胰蛋白酶是一种水解蛋白质中 L-赖氨酸及 L-精氨酸残基位于羧基端一侧肽键的酶^[21]. 在一分子卵黄高磷蛋白质中,有 26 个精氨酸及赖氨酸残基^[19]. 如果卵黄高磷蛋白质被胰蛋白酶彻底水解,则所得肽所含的氨基酸残基数平均为 8,与本实验中氯化钡沉淀法所得结果相近. 表 1 数据说明,卵黄高磷蛋白质上所有能被胰蛋白酶水解的肽键,

绝大部分已被水解。从表 2 结果看出 ,用超滤法所得的 PPP 中 ,丝氨酸含量有较大幅度下降 ,说明产物中一些含丝氨酸的小肽片断 ,如 Asp 54 - Lys 60 等^[19] ,或许已通过超滤膜进入滤出液中。除丝氨酸外 ,其它各氨基酸成分与文献数据差别不大。

表 2 各种不同来源卵黄高磷蛋白及水解肽的氨基酸组成
Tab.2 Amino acid composition of phosvitin and phosphopeptides

氨基酸	Losso ¹⁾	Byrne ²⁾	BaCl ₂ 沉淀法 ³⁾	超滤法 ⁴⁾
Asx	7.07	5.99	9.50	10.67
Thr	2.16	1.84	2.17	2.57
Ser	51.12	56.68	40.84	32.39
Glx	6.90	5.07	7.37	9.20
Pro	1.57	1.38	0.54	4.13
Gly	3.07	2.30	3.64	3.84
Ala	4.16	3.23	4.38	4.87
Val	1.90	1.38	1.57	2.83
Met	0.65	0.46	0.48	0.94
Ile	1.03	0.92	0.45	1.72
Leu	1.91	1.38	1.11	3.92
Tyr	0.58	0.46	0.58	0.96
Phe	1.07	0.46	1.16	1.46
Lys	6.73	6.91	12.54	8.97
His	4.53	5.99	6.66	6.18
Arg	5.19	5.07	7.01	5.36
Trp	0	0.46	*	* ⁵⁾

注 :1) 根据文献 [13] 得到 ;2) 根据文献 [21] 得到 ;3) BaCl₂ 沉淀法得到的磷酸肽 ;4) 超滤法得到的磷酸肽 ;5) * 色氨酸未测定。

2.5 钙络合能力试验

将 CPP 与含有不同磷酸基含量(磷酸基占总氨基酸残基)的卵黄高磷蛋白磷酸肽 PPP-I(65%)、PPP-II(35%)及 PPP-III(17.5%) ,分别与磷酸钙混合 ,然后测定可溶性钙含量。PPP 显示出具有抑制钙与磷酸结合形成沉淀的能力。加入磷酸肽后 ,体系中 pH 值下降 ,说明体系中的钙离子与磷酸肽形成了络合物 ,释放出 H⁺。由于低 pH 值能增加磷酸钙的溶解度 ,因而在试验中采用加入 0.05 mol/L 的 NaOH 溶液将酸度保持恒定。图 5 结果说明了含有不同磷酸基含量 PPP 与 CPP 对钙络合能力的影响。PPP-II、PPP-III 及 CPP 对钙有较强的络合作用 ,其中 ,PPP-II 对磷酸钙有最大的溶解能力 ,200 mg/L 的样品可使磷酸钙中溶解出的 Ca 达 36.3 mg/L ,因而证明 PPP 具有促钙溶解作用^[12-22]。PPP 中所含的磷酸基含量对钙溶解能力有较大影

响 ,说明磷酸肽中磷酸基含量与肽链长度(氮磷比)对溶解钙能力至关重要(见图 6)。

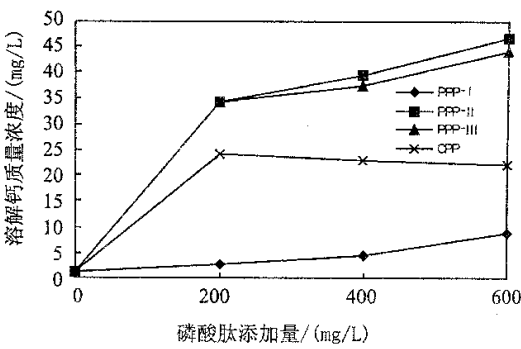


图 5 不同来源的磷酸肽对溶解磷酸钙沉淀的影响
Fig.5 Inhibition of calcium phosphate precipitation with phosphopeptides.

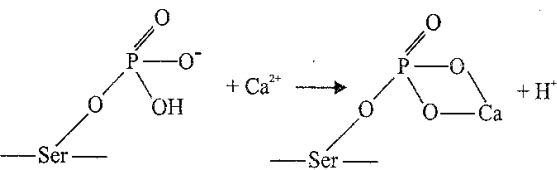


图 6 体系中钙离子与 PPP 结合反应式
Fig.6 The scheme of Ca²⁺ complexed with PPP.

需要说明的是 ,商品化的 CPP 通常已达钙离子饱和 ,脱钙的 CPP 具有从磷酸钙中结合钙的能力 ;钙饱和的 CPP 还具有抑制磷酸钙沉淀的能力^[19]。而 PPP 是否具备该能力以及它对体内钙吸收的影响仍有待进一步实验的证实。

本试验结果表明 ,将卵黄高磷蛋白质经部分脱磷后再经胰蛋白酶水解 ,可得到小分子磷酸肽。SDS-PAGE 电泳结果显示 ,PPP 相对分子质量小于 4 000。说明由于碱处理 ,卵黄高磷蛋白质分子结构已被改变 ,大多数赖氨酸及精氨酸残基侧肽键可被水解。因此 ,作者认为 ,在蛋白酶水解前进行合适的碱处理 ,可制备出含有 10~20 个氨基酸残基的磷酸肽。本实验证明了含有 35% 磷酸基的 PPP 对抑制不溶性磷酸钙沉淀、促进钙溶解非常有效。作者提出的碱脱磷方法可以卵黄高磷蛋白质为原料 ,制备得到 10~20 个氨基酸残基的磷酸肽 ,从而使 PPP 成为一种潜在的可用于促钙吸收的保健食品功能因子。

致谢 本研究由加拿大 Ontario Egg Producers Marketing Board 资助完成。

参考文献

[1]MECHAM D K ,OLCOTT H S. Phosvitin , the principal phosphoprotein of egg yolk[J]. **J Am Chem Soc** ,1949 , 71 :3670 ~ 3679.

[2]TABORSKY G ,MOK C. Phosvitin :Homogeneity of molecular weigh[J]. **J Biol Chem** ,1967 , 242 :1495 ~ 1501.

[3]TABORSKY G. Phosvitin[J]. **Adv Inorg Biochem** ,1983 (5) 235 ~ 279.

[4]GOULAS A ,TRIPLETT E L ,Taborsky G. Oligophosphopeptides of varied structural complexity derived from the egg phospho-protein , phosvitin[J]. **J Protein Chem** ,1996 , 15 :1 ~ 9.

[5]MORRIS E R ,GREENE F E. Utilization of the iron of egg yolk for hemoglobin formation by the growing ra[J]. **J Nutr** ,1972 , 102 :901 ~ 908.

[6]TABORSKY G. Iron binding by phosvitin and its conformational consequences[J]. **J Biol Chem** ,1980 , 255 :2976 ~ 2985.

[7]ALBRIGHT K J ,GORDON D T ,COTTERILL O J. Release of iron from phosvitin by heat and food additives[J]. **J Food Sci** , 1984 , 49 :78 ~ 81.

[8]MYKKANEN H M ,WASSERMANN R H. Enhanced absorption of calcium by casein phosphopeptides in rachitic and normal chicks[J]. **J Nutr** ,1980 , 110 :2141 ~ 2148.

[9]SATO R ,NOGUCHI T ,NAITO H. Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine[J]. **J Nutr Sci** , 1986 , 32 :67 ~ 76.

[10]WEST D W. Structure and function of the phosphorylated residues of casein[J]. **J Dairy Res** ,1986 , 53 :333 ~ 352.

[11]MEISEL H ,SCHLIMME E. Milk proteins :precursors of bioactive peptide[J]. **Trends in Food Sci & Technol** ,1990 (1) :41 ~ 43.

[12]GERBER H W ,JOST R. Casein phosphopeptides :their effect on calcification In vitro cultured embryonic rat bone[J]. **Calcif Tissue Int** ,1986 , 38 :350 ~ 357.

[13]LOSSO J N ,NAKAI S A. In Egg Uses and Processing Technologies :New Developments[M]. Oxon :Cab International , 1994.

[14]HEGENAUER J ,RIPLEY L ,NACE G. Staining acidic phosphoproteins (phosvitin) in electrophoretic gels[J]. **Anal Biochem** , 1977 , 78 :308 ~ 311.

[15]BARTLETT G R. Phosphorus assay in column chromatography[J]. **J Biol Chem** ,1959 , 234 :466 ~ 468.

[16]MANSON W ,ANNAN W D. The structure of a phosphopeptide derived from κ -casein[J]. **Arch Biochem Biophys** ,1971 , 145 :16 ~ 26.

[17]FIELDS R. The rapid determination of amino groups with TNBS. In Methods in Enzymology[M]. New York :Academic Press , 1972.

[18]SATO R ,SHINDO M ,GUNSHIN H et al. Characterization of phosphopeptide derived from bovine κ -casein :an inhibitor to intra-intestinal precipitation of calcium phosphat[J]. **Biochim Biophys Acta** ,1991 , 1077 :413 ~ 415.

[19]BYRNE B M ,VAN HET SCHIP A D ,VAN DE KLUNDERT J A M et al. Amino acid sequence of phosvitin derived from the nucleotide sequence of part of the chicken vitellogenin gene[J]. **Biochem** ,1984 , 23 :4275 ~ 4279.

[20]ADLER-NISSEN J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic acid[J]. **J Agric Food Chem** ,1979 , 27 :1256 ~ 1262.

[21]BARMAN T E. In Enzyme Handbook[M]. New York :Springer-Verlag , 1969.

[22]BERROCAL R ,CHANTON S ,JUILLERAT M A et al. Tryptic phosphopeptides from whole casein[J]. **J Dairy Res** ,1989 , 56 :335 ~ 341.

(责任编辑 朱 明)