

蛋黄中卵黄高磷蛋白的提取优化及其磷酸肽制备

李再新, 梁仁明, 郑 姣, 张 伟, 赵雪箐, 曾 妙, 文 倩, 张 智*

四川理工学院化学与制药工程学院, 自贡 643000

摘要: 卵黄高磷蛋白是已知天然蛋白中含磷量最高的蛋白, 经适宜蛋白酶水解后形成磷酸肽, 该磷酸肽能够与 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 等二价金属离子结合形成可溶性络合物, 抑制磷酸钙等非可溶性磷酸盐的形成, 从而促进机体对钙、铁的吸收。本文主要探索了不同缓冲溶液、不同稀释程度、不同 pH 值等因素对卵黄高磷蛋白提取效果的影响, 并在单因素实验的基础上采用正交试验, 进一步优化了卵黄高磷蛋白的提取工艺。结果表明, 应用 10 倍体积的 0.05 M 的 pH 5.2 的醋酸-醋酸钠溶液提取的卵黄高磷蛋白效果较好, 每 10 mL 的卵黄可以提取约 90 mg 的卵黄高磷蛋白。提取的卵黄高磷蛋白成品含磷量为 7.2%, N/P 比为 3.9。经过进一步脱磷、酶解等处理制备了卵黄高磷蛋白磷酸肽, 该磷酸肽能明显阻滞磷酸钙沉淀的形成, 每 100 mg 能够结合 9.1 mg 的钙。本实验结果, 为后续动物体内补钙功能实验及相关磷酸肽补钙制剂的研发奠定了基础。

关键词: 卵黄高磷蛋白; 磷酸肽; 钙结合

中图分类号: R931.4

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.03.024

Isolation of Egg Yolk Phosvitin and Preparation of Its Phosphopeptides

LI Zai-xin, LIANG Ren-ming, ZHENG Jiao,

ZHANG Wei, ZHAO Xue-qing, ZENG Miao, WEN Qian, ZHANG Zhi*

School of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Sichuan University of science and engineering, Zigong 643000, China

Abstract: Egg yolk phosvitin is the highest phosphorylated protein found in the nature, and is considered to be the best source for phosphopeptides production. Phosphopeptides can effectively bind calcium, iron and magnesium, and inhibit the formation of insoluble calcium phosphates or iron complexes. Phosphopeptides are developed as a new carrier to promote the body's absorption of calcium, iron and magnesium. In this paper, several important technologic conditions of phosvitin preparation, including buffer solution, pH and dilution times were optimized by the single factor test and orthogonal experiment. The results showed that phosvitin can be well isolated with 10 volumes of 0.05 M pH 5.2 NaAc buffer dilution. The yield of phosvitin was 90 mg from 10 mL of egg yolk, and its the phosphorus content was 7.2%, the N/P ratio was 3.9. Furthermore, the phosvitin product was dephosphorized with 0.2 M NaOH for 2 h, and then hydrolyzed with trypsin for 4 h to get phosphopeptide. In the further experiment, the phosvitin phosphopeptide product was demonstrated to have a strong activity of blocking formation of calcium phosphate precipitation, and its calcium binding ability reached up to 9.1%. Altogether, these results laid solid foundation for further *in vivo* studying the function of phosvitin phosphopeptide.

Key words: phosvitin; phosvitin phosphopeptide; calcium binding

卵黄高磷蛋白(Phosvitin, PV)是从卵黄中提取到的一类含磷蛋白质, 其分子量为 35 kDa, 含磷 9.7%, 拥有成簇的丝氨酸, 其磷酸根几乎都是以 O-磷酸酰丝氨酸形式存在, 是目前已知含磷量最高的蛋白^[1,2]。卵黄高磷蛋白在禽蛋、鱼卵等的卵黄中含量丰富, 具有好的乳化性、抗氧化性、抗菌活性和金

属离子结合活性^[3]。体外采用生物酶解技术, 对卵黄高磷蛋白进行酶解而制备成的卵黄高磷蛋白磷酸肽(Phosvitin phosphopeptides, PPPs), 具有良好的 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 等二价金属离子结合活性, 显著阻止了食物中磷酸钙等非可溶性磷酸盐的形成, 因此在新型补钙生物制剂的开发方面展现了良好的潜力^[4,5]。

鸡蛋蛋黄中含有丰富的免疫球蛋白(又称卵黄抗体 IgY)、磷脂类物质、维生素和卵黄高磷蛋白等功能性营养物质, 目前国内外鸡蛋深开发的研究主要集中在卵磷脂、卵黄免疫球蛋白、溶菌酶、胆固醇,

收稿日期: 2013-09-06 接受日期: 2014-03-26

基金项目: 四川省教育厅重点项目(12ZA088); 四川理工学院人才工程项目(2011RC16); 四川理工学院大学生创新基金(2013)

* 通讯作者 E-mail: zhangzhi02@gmail.com

而对卵黄高磷蛋白磷酸肽的产品开发利用尚处于初步阶段。本文首要探讨了多个单因素对卵黄高磷蛋白提取效果的影响,在单因素实验的基础上又进行正交试验,优化了卵黄高磷蛋白的提取工艺,并将其制备成具有功能性磷酸肽,为新型补钙生物制剂的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 试验材料

用于提取卵黄免疫球蛋白的新鲜鸡蛋,由本实验室清洁级产蛋鸡养殖动物房提供。

1.1.2 主要试剂

胰蛋白酶和牛血清蛋白 BSA 购自上海源聚生物科技有限公司;丙烯酰胺(Acr)、N-N-甲叉双丙烯酰胺(Bis)均购置于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,分析纯;标准中分子量标记蛋白购置北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,生化纯。十二烷基磺酸钠 SDS、醋酸钠、醋酸钠、盐酸、无水乙醇、正己烷、氯化钠和考马斯亮蓝 G-250 等化学试剂均购自成都科龙化工试剂厂,均为分析纯。

1.1.3 主要仪器

UPH-II-20T-优普超纯水制造系统,成都超纯科技有限公司;JA5103N 精密酸碱计,上海大普仪器有限公司;BT85 型冷冻干燥机,美国 MILLIROCK TECHNOLOGY;H-1850R 型台式高速冷冻离心机,湖南湘仪离心机仪器有限公司;101-3AB 恒温鼓风干燥箱,天津泰斯特仪器有限公司;7500D 透析袋,碧云天生物科技有限公司;756PC 紫外分光光度计,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;TS2-310 凝胶成像仪,美国 UVP 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 卵黄高磷蛋白的提取

收集新鲜鸡蛋,用新洁尔灭将其消毒并洗净;小心轻敲蛋壳,取出蛋黄,按文献^[6]进行卵黄高磷蛋白的提取,并做适当修改:收集卵黄→加适当溶液稀释,静置 6h→10000 rpm 离心 15 min,获得沉淀→加入有机溶剂脱脂,混匀放置 4 h→10000 rpm 离心 15 min 获得沉淀,加入 NaCl 溶液浸提→10000 rpm 离心 15 min,取上清液→透析→冷冻真空干燥得卵黄高磷蛋白成品。

1.2.2 卵黄高磷蛋白提取工艺条件优化的单因素试验

探讨不同稀释程度、不同 pH 值和不同缓冲溶

液对卵黄高磷蛋白提取的影响,其方法如下。

1.2.2.1 稀释程度对卵黄高磷蛋白提取的影响试验

取 5 份 5 mL 的鸡蛋卵黄液于编号分别为 1 到 5 的烧杯中,然后向烧杯中分别加入 10、20、30、40、50 mL 的超纯水,即用超纯水稀释 2、4、6、8、10 倍,充分搅拌,4 °C 环境中静置 6 h 后,10000 rpm 离心 15 min,称取下层沉淀的湿重,并对沉淀进行目视检查。从沉淀中提取卵黄高磷蛋白,SDS-PAGE 凝胶电泳检测。

1.2.2.2 pH 对卵黄高磷蛋白提取的影响试验

分别向编号为 1 到 9 的烧杯中加入等体积的 5 mL 卵黄液和 40 mL 的超纯水,充分搅拌,用稀 HCl 和 NaOH 将卵黄液的 pH 调至 3、4、5、6、7、8、9、10、12;4 °C 静置 6 h,10000 rpm 离心 15 min,称取下层沉淀湿重,并对沉淀进行目视检查。从沉淀中提取卵黄高磷蛋白,SDS-PAGE 凝胶电泳检测。

1.2.2.3 缓冲溶液对卵黄高磷蛋白提取的影响试验

取编号为 1、2、3 的烧杯,各加入 5 mL 的卵黄液;1 号加入 40 mL pH 5.2 的 0.05 M 醋酸-醋酸钠缓冲溶液,充分搅拌;2 号加入 40 mL 的超纯水,用盐酸将 pH 都调至 5.2,充分搅拌;3 号加入 40 mL pH 5.2 的 0.01 M 磷酸盐 PBS 缓冲溶液,充分搅拌。4 °C 中静置 6 h,10000 rpm 离心 15 min,称取下层沉淀湿重,并对沉淀进行目视检查。从沉淀中提取卵黄高磷蛋白,SDS-PAGE 凝胶电泳检测。

1.2.3 卵黄高磷蛋白的提取工艺正交优化试验

综合考虑单因素试验结果,选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验设计,设定三因素三水平正交试验,见表 1。每次试验的原料为 5 mL 卵黄液,以各个试验所提取卵黄高磷蛋白的总磷含量高低作为试验结果,通过极差分析优选出最佳工艺条件组合。

1.2.4 卵黄高磷蛋白磷酸肽的制备

将上述提取的卵黄高磷蛋白,按文献^[7]进行制备磷酸肽,并略做修改,步骤如下:称取 0.2 g 卵黄高磷蛋白成品→加入 20 mL 0.2 M NaOH 在 40 °C 下脱磷 2 h→调节 pH 7.0 终止脱磷并 4 °C 透析→加入底物浓度 5% 的胰蛋白酶 40 °C 下酶解 4 h→调节反应体系 pH 至 5.0 终止酶解,冷冻干燥得磷酸肽成品。

1.2.5 卵黄高磷蛋白的 SDS-PAGE 检测

取提取的卵黄高磷蛋白样品 10 μg,加入 5 μL

蛋白上样缓冲液,煮沸 5 min;取出冰浴 3 min,10000 rpm 离心 5 min,取上清,进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳检测。

表 1 正交实验因素和水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments

水平 Level	因素 Factor		
	A 稀释倍数 Dilution	B pH	C 缓冲液 Buffer
1	6	4	醋酸钠缓冲液 (NaAc buffer)
2	8	5	磷酸盐缓冲液 (PBS buffer)
3	10	6	(water)

1.2.6 氮磷摩尔比的测定 (N/P)

蛋白质中的磷含量测定采用 Morrison 微量定磷法,单位质量样品中的磷含量用 $P\%$ 表示;蛋白质中的氮含量测定按照凯氏定氮法进行,单位质量样品中的氮含量用 $N\%$ 表示。N/P 比值按以下公式计算:

$$N/P = \frac{N\% \times 32}{P\% \times 14}$$

1.2.7 磷酸钙沉淀阻滞试验

分别取 50、100、200、400、500 mg 的卵黄高磷蛋白磷酸肽制品于 5 只 1000 mL 烧杯中,加入 460 mL 的超纯水充分溶解后,使磷酸肽的浓度分别为 100、200、400、800、1000 ppm;分别加入 40 mL 的 0.1 M CaCl_2 和 0.1 M NaH_2PO_4 使其浓度都为 0.008 M,即 $\text{Ca}^{2+}:\text{PO}_4^{3-} = 1:1$,迅速用 0.1 M 的 NaOH 将反应体系的 pH 调至 7.2,并不断用 0.1 M 的 NaOH 将 pH 维持在 7.2,每 2 min 记录一次 NaOH 的消耗量,直至 1 h 后结束试验。以时间为横坐标,NaOH 消耗量为纵坐标作图。NaOH 的累积消耗量越小和消耗速度越慢,说明阻滞磷酸钙沉淀的效果越好。

1.2.8 持钙量测定

准确称取 40 mg 的磷酸肽于反应体系为 40 mL 烧杯中,加入 28 mL 的超纯水充分溶解,再加入 2 mL 的 0.1 M 的 CaCl_2 使其浓度达到 5 mmol/L,搅拌,加入 10 mL 的 pH 8 的 80 mmol/L 的磷酸缓冲液,使其浓度达到 20 mmol/L,迅速用 0.1 M 的 NaOH 将 pH 调至 7.8,并一直将 pH 维持在 7.8,30 min 后取适量样品液离心取上清液。同时设置以不含磷酸肽的超纯水为对照。分别取对照组和样品组的上清液 5 mL,进行消化处理。消化后将消化液定容至 50 mL,取 15 mL 于比色管中,加入 2 mL 的硝

酸镉,再用 0.3 M 的 HCl 定容至 25 mL,混匀。采用原子吸收光谱法测定其吸光度,根据标准曲线计算样品液中的含钙量,并磷酸肽的持钙量。标准曲线:用原子光谱吸收法测定浓度为 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准钙溶液的吸光度,以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,制作标准曲线。

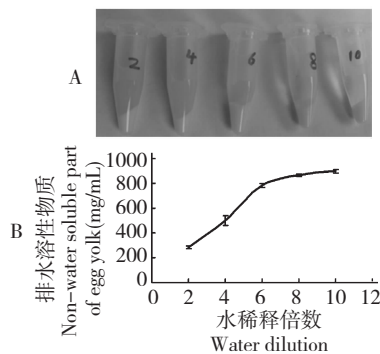
1.2.9 数据处理

对单因素试验数据统计均采用 t -检验, $P < 0.05$ 为显著性差异;对 $L_9(3^4)$ 正交试验结果采用极差分析。

2 实验结果

2.1 单因素试验结果

卵黄高磷蛋白提取工艺的单因素试验结果表明,水稀释程度显著影响了卵黄中水溶性和非水溶性成分的分离,随着稀释程度的增加,二者逐渐达到有效分离,当稀释度在 8 倍及以上水相逐渐变为澄清透明,非水溶性物质沉淀量亦达到最大(图 1A/B)。固定水稀释度为 8 倍,调节卵黄稀释液 pH(3~12),当 pH 为 4 时,非水溶性沉淀量达到最大,后随 pH 继续增大而减少(图 2A);但 pH 为 4 时从非水溶性物质沉淀中提取的卵黄高磷蛋白量并不是最大,而在 pH 为 5 左右其得到的卵黄高磷蛋白量较大(图 2B)。固定稀释度为 8 倍,pH 为 5.2,分别应用水和醋酸钠缓冲液来稀释卵黄;结果如图 3A 所

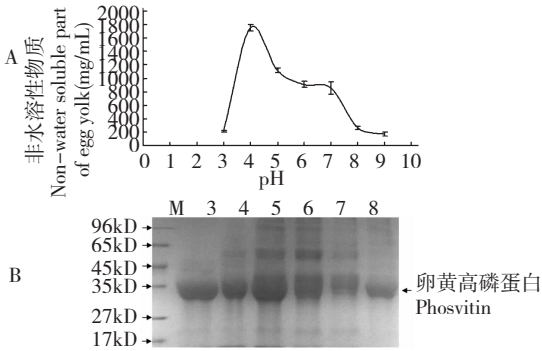


A:不同水稀释倍数(分别为2、4、6、8和10倍)对水溶性组分澄清度的影响;B:不同水稀释倍数下每 mL 蛋黄的非水溶性物质沉淀得率,单位 mg/mL

A: Effect of different water dilution times (2, 4, 6, 8, 10 times, respectively) on clarity of water-soluble components; B: Precipitation yields of non-water soluble component of egg yolk with different water dilution times (Unit: mg/mL)

图 1 水稀释倍数对非水溶性物质沉淀得率的影响

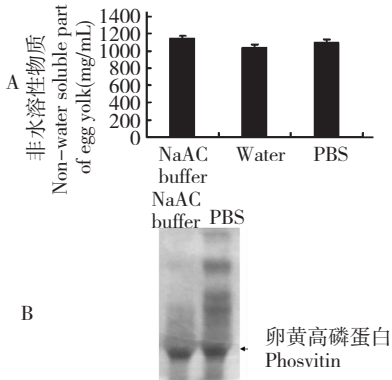
Fig. 1 Effect of water dilution on precipitation of non-water soluble component of egg yolk



A:不同 pH 下每 mL 蛋黄的非水溶性物质沉淀得率,单位 mg/mL;B:将 A 图得到的沉淀进一步提取卵黄高磷蛋白(≈35kD),并应用 SDS-PAGE 对其进行分析;M,标准蛋白 Marker
A: Precipitation yields of non-water soluble component of egg yolk with different pH values (Unit:mg/mL);B: SDS-PAGE analysis results of phosvitin extracted from the precipitate (≈35kD);M: Standard protein marker

图 2 pH 对非水溶性物质沉淀得率的影响

Fig. 2 Effect of pH on precipitation of non-water soluble component of egg yolk



A:不同缓冲液体系下每 mL 卵黄的非水溶性物质得率,单位 mg/mL;B:将 A 图得到的沉淀进一步提取卵黄高磷蛋白(≈35kD),并用 SDS-PAGE 进行检测的结果;
A: Precipitation yields of non-water soluble component of egg yolk with different buffer solutions (Unit: mg/mL); B: SDS-PAGE analysis results of phosvitin extracted from the precipitate (≈35kD)

图 3 缓冲液对非水溶性物质得率的影响

Fig. 3 Effect of buffer on precipitation of non-water soluble component of egg yolk

示,尽管醋酸钠缓冲液所得的非水溶性成分沉淀量稍高,但与 PBS 缓冲液和水稀释液相比统计上没有显著性差异;应用 SDS-PAGE 分析所提取的卵黄高磷蛋白,发现醋酸钠缓冲液所得卵黄高磷蛋白纯度相对水溶液较高(图 3B),N/P 比值低。

2.2 正交试验结果

三因素三水平正交实验优化卵黄高磷蛋白的提

取。工艺的试验结果如表 1 所示,从其中的极差数据可看出,对卵黄高磷蛋白产物磷含量影响最大的因素是 pH,最小的是缓冲液的选择;而试验因素和水平的最佳条件组合为 A₃B₂C₁。即应用 10 倍体积 0.05 M pH 5.2 的醋酸-醋酸钠溶液提取卵黄高磷蛋白的效果相对最佳。按此工艺从每 10 mL 的卵黄可以提取 90 mg 左右的卵黄高磷蛋白,纯度较高(图 4),其含磷量为 7.2%,N/P 比值为 3.9。

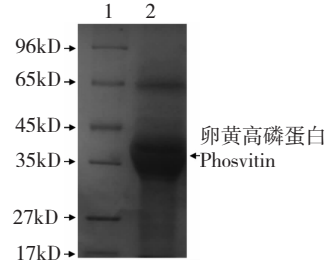


图 4 SDS-PAGE 检测提取的卵黄高磷蛋白
Fig. 4 Analysis of isolated phosvitin by SDS-PAGE

表 2 正交实验结果

Table 2 Results of orthogonal experiments

编号 No.	因素 Factor			总磷含量 Content of phosphate (mg)
	A	B	C	
1	1	1	1	2.85
2	1	2	2	3.05
3	1	3	3	2.95
4	2	1	2	2.95
5	2	2	3	3.15
6	2	3	1	3.10
7	3	1	3	3.00
8	3	2	1	3.22
9	3	3	2	3.15
K1	8.85	8.8	9.17	
K2	9.20	9.42	9.15	
K3	9.37	9.20	9.10	
R	0.52	0.62	0.07	

2.3 卵黄高磷蛋白磷酸肽对磷酸钙沉淀的阻滞作用

按照 1.2.7 项所述试验对制备成的磷酸肽成品的体外持钙功能加以评价。结果如图 5 所示,在反应体系中,当磷酸肽浓度在 200 ppm 以上,随着磷酸肽浓度的升高其阻滞磷酸钙沉淀形成的效果越好;

当磷酸肽浓度达到 1000 ppm 时,对磷酸钙沉淀的阻滞作用可达到 60 min 以上。

2.4 卵黄高磷蛋白磷酸肽持钙量测定结果

采用原子光谱吸收的方法,对制备的磷酸肽的持钙量进行了定量分析。结果表明,实验制备的磷酸肽,每 100 mg 的磷酸肽能够结合 9.1 mg 的钙。

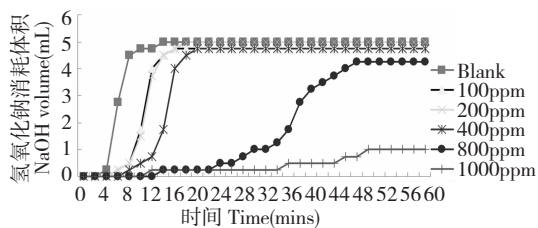


图5 不同浓度的卵黄高磷蛋白磷酸肽对阻滞磷酸钙沉淀形成的效果

Fig.5 Effect of different concentrations of phosvitin phosphopeptide on calcium phosphate precipitation

3 讨论

鸡蛋蛋黄中含有丰富的卵黄抗体 IgY、磷脂、维生素和卵黄高磷蛋白等天然的功能性营养物质,从蛋黄中针对性提取多种功能性营养成分,达到有效综合利用鸡蛋的目的,具有十分重要的意义。卵黄主要包括水溶性成分和非水溶性成分,卵黄抗体主要存在于水溶性成分中,而卵黄高磷蛋白与脂物质形成非水溶性的脂蛋白颗粒物质。目前多用水稀释法将卵黄水溶性成分与非水溶性脂蛋白颗粒沉淀分离^[8],但 pH 值、水稀释程度和缓冲溶液选择等因素对卵黄高磷蛋白提取效果的具体影响还不清楚。本研究表明,应用 10 倍体积的 0.05 M 的 pH 5.2 的醋酸-醋酸钠溶液,其提取的卵黄高磷蛋白效果较为理想。尽管应用 10 倍以上更高的稀释倍数可以将水溶性与非水溶性很好分离,但统计上无显著差异。有趣的是,当调节 pH 为 4 时,非水溶性颗粒沉淀量达到最大,而后随 pH 增大而减少,但从中提取的卵黄高磷蛋白量并不是最大,而在 pH 为 5 左右其得到的卵黄高磷蛋白量较为理想(图 2A/B),其具体的原因还不明了。

人体内的钙主要来自食物,但并非食物中所有的钙都能被人体吸收利用,一般情况下的吸收率仅为 20% ~ 30%。食物中的钙在肠道中与磷酸根结合形成磷酸钙沉淀,而阻止了机体对钙的正常吸收^[9],因此寻找一种合理的补钙方式显得非常必要。卵黄高磷蛋白磷酸肽含有成簇的磷酸肽丝氨酸

残基,可与钙离子形成可溶性络合物,阻止其形成沉淀。本研究结果亦证实,当磷酸肽浓度达到 1000 ppm 时,其能明显阻滞磷酸钙沉淀的形成达到 60 min 以上(图 5)。Inwook C 等^[10]研究发现,若在日常饮食中添加浓度为 0.125% ~ 0.5% 卵黄高磷蛋白磷酸肽,肠道内钙的吸收和蓄积作用明显升高,相当于在日常食谱中添加 25% ~ 100% 的钙。由此表明,卵黄高磷蛋白磷酸肽在体内可促进机体对钙的吸收和蓄积作用,提高机体对钙的生物利用率。因此,将卵黄高磷蛋白磷酸肽开发成一种新型补钙制剂,与常规饮食联用,即能强化蛋白营养素,亦能达到提高膳食钙吸收利用的目的,具有很重要的现实意义。

参考文献

- 1 Taborsky G, Mok C. Phosvitin: Homogeneity of molecular weight. *J Biol Chem*, 1967, 242:1495-1501.
- 2 Taborsky G. Phosvitin. *Adv Inorg Biochem*, 1983, 5:235-279.
- 3 Samaraweera H, Zhang WG, Lee EJ, et al. Egg yolk phosvitin and functional phosphopeptides-review. *J Food Sci*, 2011, 76: 143-150.
- 4 Wang F(王飞), Liu JB(刘静波), Lin SY(林松毅), et al. Effects of phosvitin phosphopeptides-calcium on apparent absorptivity of calcium in mice. *Food Sci(食品科学)*, 2008, 92:654-657.
- 5 Jung S, Kim DH, Son JH, et al. The functional property of egg yolk phosvitin as a melanogenesis inhibitor. *Food Chem*, 2012, 135:993-998.
- 6 Zhang XY(张小燕), Liu XL(刘小丽), Fan XD(范晓东). Study on the process of phosvitin isolation. *Food Sci(食品科学)*, 2002, 23(8):85-87.
- 7 Jiang B, Mine Y. Phosphopeptides derived from hen egg yolk phosvitin: Effect of molecular size on the calcium-binding properties. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001, 65:1187-1190.
- 8 Liu Y(刘瑜), Yin YG(殷涌光), Liu JB(刘静波), et al. Study on the functional property and preparation method of egg yolk phosvitin. *Food Sci(食品科学)*, 2006, 27:863-866.
- 9 Tang YJ(汤亚杰), Wu XF(吴思方). Study on the process of casein phosphopeptide. *Food Sci(食品科学)*, 1998, 19(5):3-6.
- 10 Inwook C, Changhwa J, Heedon C, et al. Effectiveness of phosvitin peptides on enhancing bioavailability of calcium and its accumulation in bones. *J Food Chem*, 2005, 93:577-583.