

咸蛋清中几种重要蛋白质的提取和纯化

白菁, 纪胜男, 邹婕, 黄茜*

(华中农业大学食品科学技术学院 国家蛋品加工技术研究中心 武汉 430070)

摘要 咸蛋清是蛋黄加工过程中的副产品。为提高咸蛋清的利用率,本研究建立了一种简单可行,低成本,可连续分离咸蛋清中几种重要蛋白质的工艺方法。本文利用等电点沉淀法、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析和醇沉等方法从咸蛋清中依次分离出卵黏蛋白、卵白蛋白和卵类黏蛋白。研究结果显示:在实验室规模下,卵黏蛋白、卵白蛋白和卵类黏蛋白的产率分别达到 83%,98% 和 76%,SDS-PAGE 凝胶电泳显示,3 种蛋白质的纯度分别为 89%,92%和 98%。此外,采用醇沉分离的卵白蛋白在复溶后仍具有良好的起泡性,说明分离方法能较好地保持蛋白质的功能特性。

关键词 咸蛋清; 蛋白质; 连续分离; 蛋白纯化; 功能特性

文章编号 1009-7848(2023)06-0203-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.06.021

咸鸭蛋是新鲜鸭蛋在高盐环境下腌制而得的中国传统特色食品,因口味鲜美、营养丰富而深受人们的喜爱。近年来,随着食品的不断创新发展,咸鸭蛋不仅作为辅食食品出现在餐桌上,油黄沙润的咸蛋黄还随着咸蛋黄月饼、咸蛋黄青团、咸蛋黄粽子等产品的“走红”而消耗量倍增。然而,咸蛋清中的盐分含量较高,咸蛋清中高达 10%的蛋白质未得到较好的利用。少部分咸蛋清会以较低比例掺入鲜蛋清中加工成为低端产品或简单脱盐后作为饲料出售,加工方式粗放,造成大量高活性蛋白质的损失和浪费,不利于蛋品的精深加工,且大部分咸蛋清被直接丢弃并腐败、发酵,对环境造成一定污染^[1]。咸蛋清的有效利用和合理处理,成为食品工业亟待解决的问题。

目前国内外对于咸蛋清的研究利用较少,主要集中在功能特性的利用、蛋白质和生物活性肽的提取、脱盐技术 3 个方面^[2]。咸蛋清因具有含盐量高、乳化、凝胶、起泡等特性,可直接加至食品原料中以改善食品特性^[3]。肖功年、Tan、王智云等^[4-6]凭借咸蛋清较好的乳化性和凝胶性质,将其分别添加到鱼糜制品、面条、豆腐中,以改善食品的凝胶硬度、保水性和口感。除了良好的功能特性外,咸蛋清中还含有许多优质的蛋白质,如溶菌酶、卵

白蛋白、卵类黏蛋白、卵黏蛋白等。溶菌酶能够水解革兰氏阳性菌细胞壁中的肽聚糖,是一种天然、安全的杀菌剂和防腐剂,被广泛应用于食品、医药、日用化工等领域^[7]。卵白蛋白在蛋白质分析中被广泛用作标准蛋白,其水解肽具有增强免疫、抗氧化等生物活性功能^[8]。卵类黏蛋白作为胰蛋白酶抑制剂,可用于有效传递胃肠敏感药物^[9]。卵黏蛋白是一种糖蛋白,具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用^[10]。充分利用废弃的咸蛋清资源,从中分离、提取有用蛋白质,可减少环境污染,同时提高企业的经济效益。

目前,提取咸蛋清中的蛋白质主要集中在溶菌酶上。崔春等^[11]通过酸、热处理沉淀蛋清蛋白,经离心、过滤和超滤、冷冻干燥获得溶菌酶,该方法未提及溶菌酶的得率和纯度。Yang 等^[12]采用阴离子多糖从 5 倍稀释的咸蛋清中分离溶菌酶,回收率仅为 60%~65%。Ding 等^[13]发明一种以 L-甲状腺素为亲和配基的再生型亲和沉淀剂,从咸鸭蛋清中纯化出溶菌酶,回收率为 94.32%,该方法使用的亲和培养基价格昂贵,成本较高。而从咸蛋清中分离其它蛋白质尚未见研究报道。大部分单一蛋白质的提取还是以蛋清为原料,其中卵白蛋白的分离方法主要有超滤法、电泳法、泡沫分馏法、液相色谱法^[14]。这些方法分离过程较为复杂,很难扩大规模推广应用。Abeyrathne 等^[14]通过饱和硫酸铵和柠檬酸沉淀分离卵白蛋白,得到较高的纯度并保留蛋白活性。卵类黏蛋白有较好的热稳定性,曾有人尝试通过加热沉淀除去卵类黏蛋白以外的

收稿日期: 2022-06-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32072237);湖北省自然科学基金面上项目(2020CFB583)

第一作者: 白菁,女,本科生

通信作者: 黄茜 E-mail: huangxi@mail.hzau.edu.cn

蛋白质,然而,该方法仅能有效分离卵类黏蛋白这样的单一蛋白,剩余蛋白质在此过程中发生变性,未得到较好的利用^[15]。Tanabe等^[16]使用25%乙醇从蛋清中分离卵类黏蛋白,回收率约70%,其纯度未报道。史晓霞^[17]采用TCA-丙酮法粗分离,DEAE-32离子交换层析法纯化的方法制备卵类黏蛋白,回收率仅23.8%,纯度为95.3%。卵黏蛋白是蛋清中的高活性糖蛋白,其高黏性是维持新鲜鸡蛋胶体特性的重要因素,可以用等电沉淀法、柱凝胶过滤、电泳等方法提取出来,其中等电点沉淀法是最有效的分离卵黏蛋白的方法^[15]。然而,这些方法都是从蛋清中分离单一蛋白质,未实现连续分离,且均为实验室规模,很难工业化生产。

本研究设计出一种可以联合提取咸蛋清中几种主要蛋白质,且操作简单,易于工业化生产的分离方法,为蛋品资源利用率的提高提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

咸鸭蛋蛋清,湖北神丹健康食品有限公司提供;浓盐酸、柠檬酸、硫酸铵、无水乙醇、考马斯亮蓝R250等试剂均为国产分析纯;SDS-PAGE试剂盒,武汉市谷歌生物有限公司;SDS-PAGE上样缓冲液,碧云天生物技术;蛋白Marker,美国Thermo公司。

1.2 仪器与设备

CR22N型高速冷冻离心机,株式会社日立制作所;DYY-12电泳仪、双垂直电泳槽,北京六一仪器厂;GELDOC2000型凝胶成像系统,美国BIO-RAD公司;ALPHA1-4型真空冷冻干燥机,德国Christ公司;FSH-2A型高速分散器,中国化工仪器公司。

1.3 试验方法

1.3.1 咸蛋清样品预处理 由于本试验所用咸蛋清样品为生产工厂流水线分离所得,或残留有未彻底分离的蛋黄混入咸蛋清中,使得咸蛋清液呈橙黄色并伴有上浮油状物,为提高分离效率和蛋白纯度,需在分离蛋白前除去油状物。加入纯水稀释离心,过滤除去油状物,将上清液与沉淀均质,待用。

1.3.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳 使用SDS-PAGE

试剂按照标准,制作体积分数为12%的分离胶和体积分数为5%的浓缩胶,插入电泳梳子,加入现配电泳缓冲液(Tris,甘氨酸,SDS)液封。取80 μ L样品溶液加20 μ L SDS-PAGE上样缓冲液于1 mL离心管中混匀,上样前沸水煮5 min。上样量为10 μ L,放入双垂直电泳槽,加入电泳缓冲液,在恒流条件下,浓缩胶电压为80 V,经过浓缩胶和分离胶交界处后,分离胶电压调节至120 V。电泳结束后,取下胶片,依次置于固定液中固定30 min以上,考马斯亮蓝染色液中染色30~40 min,脱色液中振荡脱色,直至背景色脱去。获得胶片利用凝胶成像系统成像分析。

1.3.3 卵黏蛋白、卵白蛋白和卵类黏蛋白的分离 用1 mol/L的HCl和柠檬酸调节预处理后的均质液的pH值,沉淀离心,将沉淀水洗脱盐后,冷冻干燥得到卵黏蛋白。

用4%(NH₄)₂SO₄和2%柠檬酸组合盐沉淀分离卵转铁蛋白,除去卵转铁蛋白的上清液中富含卵白蛋白和卵类黏蛋白。

向除去卵转铁蛋白的上清液中分别加入终体积分数为20%,30%,40%的无水乙醇,沉淀分离卵白蛋白,将沉淀用纯水水洗3次脱醇脱盐后冷冻干燥、分离的上清液,超滤脱醇脱盐浓缩后,冷冻干燥。

根据蛋清中各种蛋白的含量百分比,计算各蛋白的理论含量值,计算卵黏蛋白、卵白蛋白和卵类黏蛋白的产率。用凝胶成像分析电泳凝胶,根据蛋白条带的密度来计算蛋白纯度。

1.3.4 卵白蛋白的复溶 将醇沉卵白蛋白配成2 mg/mL的溶液,并调节pH值,测试能使卵白蛋白复溶的最佳pH值,利用聚丙烯酰胺凝胶电泳观察蛋白质是否被水解。

1.3.5 蛋清液起泡性和泡沫稳定性的测定 通过An等^[18]的方法测定起泡性能,稍加修改。用FSH-2A型高速分散器,采用搅打法,以6 000 r/min转速对蛋清溶液进行搅打,持续2 min,记录搅打后的泡沫初始体积和静置30 min后的泡沫体积,按照下式计算蛋清的起泡性(FAI)和泡沫稳定性(FS):

$$FAI = \frac{V_0}{30} \times 100\% \quad (1)$$

$$FS = \frac{V_1}{V_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中: V_0 ——搅打后泡沫初始体积, mL; V_1 ——静置 30 min 时的泡沫体积, mL。

1.4 统计学分析

所有试验均一式 3 份, 每个样品均一式 2 份进行分析测定。数据以“平均值±标准差”表示, 并使用单因素方差分析(ANOVA)进行分析($P < 0.05$)以评估结果的显著性。使用 SPSS 软件(版本 19.0)通过 Duncan 的多范围测试比较数据。使用 Origin 软件(版本 8.5)绘制图片。

2 结果与分析

2.1 几种蛋清的电泳对比

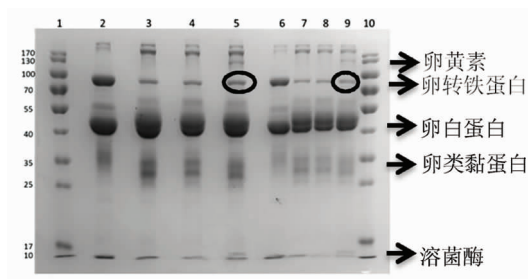
将咸蛋清样品与新鲜鸡蛋蛋清、新鲜鸭蛋蛋清、实验室供咸蛋清, 按照 1.3.2 节的方法做电泳对照。观察图 1 中的蛋白印迹, 咸蛋清与对照蛋清中均有较为清晰的卵黏蛋白、卵转铁蛋白、卵白蛋白、卵类黏蛋白、溶菌酶条带。通过对比发现鸭蛋中卵黏蛋白的含量多于鸡蛋中卵黏蛋白的含量, 而卵转铁蛋白与溶菌酶在鸭蛋中的含量明显少于鸡蛋。综上, 选定卵黏蛋白、卵白蛋白、卵类黏蛋白为主要分离蛋白。

咸蛋清样品(泳道 5, 9)在 130 ku 左右多存在一条蛋白印迹, 质谱测试该蛋白为蛋黄中卵黄素。或为残留的蛋黄中物质, 故拟对咸蛋清进行预处理, 分离蛋黄残留物。

2.2 卵黏蛋白的分离

将经过预处理后的蛋清液的 pH 值分别调节至 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 观察各条件下的卵黏蛋白分离情况; 同时分别用 HCl 和柠檬酸调节 pH 值, 试验用不同的酸处理是否会对卵黏蛋白的分离产生影响; 获得的卵黏蛋白沉淀用 1、2、3、4、5 倍纯水进行水洗, 观察沉淀水洗后的杂蛋白含量, 综合选择分离卵黏蛋白的最佳条件。结果如下:

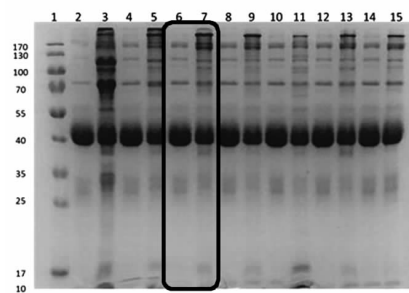
卵黏蛋白在沉淀时, 有可能会与其它蛋白质, 特别是溶菌酶结合在一起。由图 2 中蛋白印迹分析中可以看到, 当分离条件为 pH=8, 9, 10 时, 接近溶菌酶等电点, 卵黏蛋白沉淀中混有部分溶菌酶, 影响了卵黏蛋白的纯度。由于卵黏蛋白的等电点为 4.75~5.0, 当 pH 值调节至其等电点附近时, 中



注: 泳道 1、10: 标记蛋白(170 ku); 泳道 2、3、4、5: 新鲜鸡蛋蛋清、新鲜鸭蛋蛋清、实验室供咸蛋清、咸蛋清样品(20 倍稀释); 泳道 6、7、8、9: 新鲜鸡蛋蛋清、新鲜鸭蛋蛋清、实验室供咸蛋清、咸蛋清样品(40 倍稀释)。

图 1 蛋清对比电泳图

Fig.1 SDS-PAGE of egg white contrast

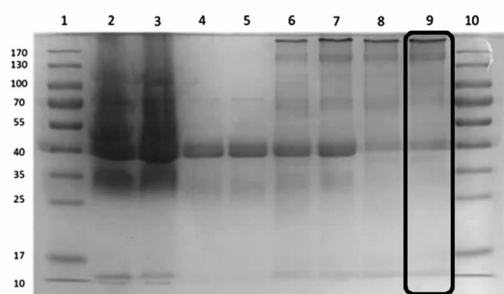


注: 泳道 1: 标记蛋白(170 ku); 泳道 2、4、6、8、10、12、14: 调节 pH=3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 时的离心上清; 泳道 3、5、7、9、11、13、15: pH=3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 时的卵黏蛋白沉淀。

图 2 pH 值对卵类黏蛋白分离影响的电泳图

Fig.2 SDS-PAGE of the effect of pH conditions on the separation of ovomucin

和了卵黏蛋白的大部分表面电荷, 通过 4 000 r/min 的离心便可以容易的将卵黏蛋白与其它蛋白质分离开^[14]。从图 3 中可以看到, 用 HCl 调节 pH 值获得的卵黏蛋白(泳道 7)比用柠檬酸调节获得的卵黏蛋白(泳道 6)浓度更高, 水洗除去沉淀中自带的卵白蛋白、卵类黏蛋白等水溶性蛋白, 对比可以看到使用 HCl 调节 pH 值可以获得纯度更高的卵黏蛋白, 效果好于柠檬酸。因为卵黏蛋白是一种纤维状蛋白质, 沉淀得到的卵黏蛋白呈面筋状^[19], 在水中溶解度极小, 而卵黏蛋白的沉淀中会含有少量的卵白蛋白、卵类黏蛋白等水溶性蛋白, 因此用纯水清洗沉淀, 可以有效除去水溶性蛋白, 而不使卵黏蛋白产生损失, 相比其它纯化方法, 可以更加简便有效的获得浓度较高的卵黏蛋白。从图 4 中可以看到, 低倍数水洗的沉淀中, 仍存在有部分



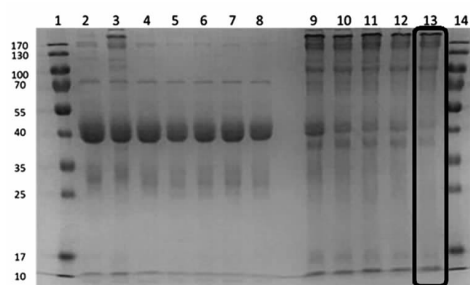
注:泳道 1、10: 标记蛋白(170 ku);泳道 2、6: 柠檬酸分离上清、卵黏蛋白;泳道 3、7:HCl 分离上清、卵黏蛋白;泳道 4、8: 柠檬酸卵黏蛋白沉淀水洗上清、沉淀;泳道 5、9:HCl 卵黏蛋白沉淀水洗上清、沉淀。

图 3 酸的种类对卵黏蛋白分离影响的电泳图

Fig.3 SDS-PAGE of the effect of acid selections on the separation of ovomucin

水溶性蛋白未被完全洗去, 而用 5 倍纯水水洗卵黏蛋白沉淀时, 因为纯水体积较大, 从而可以在溶解较多的水溶性蛋白后仍保持低蛋白浓度, 达到尽可能减少卵黏蛋白中杂蛋白的目的, 获得纯度较高的卵黏蛋白。

选择用 HCl 调节预处理后的咸蛋清液的 pH=5, 离心沉淀, 用 5 倍纯水水洗沉淀, 沉淀冻干后获得卵黏蛋白, 水洗液转入上清液中, 进行后续的蛋白分离, 减少损失。相比于张立斌等^[9]提出的, 先后在咸蛋清中加入 15 mol/L 的盐和蛋水比为 1:



注:泳道 1、14: 标记蛋白(170 ku);泳道 2: 除去卵黏蛋白的上清;泳道 3: 卵黏蛋白沉淀;泳道 4、5、6、7、8: 沉淀 1、2、3、4、5 倍水洗上清;泳道 9、10、11、12、13: 经 1、2、3、4、5 倍水洗沉淀。

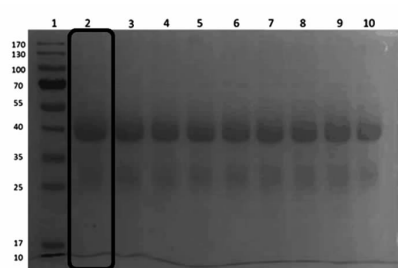
图 4 沉淀水洗倍数对卵黏蛋白纯度影响的电泳图

Fig.4 SDS-PAGE of the effect of DW vol of precipitation on the purity of ovomucin

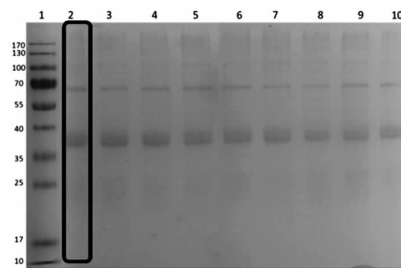
14 的盐水, 再在 25 °C 下反应分离 3 h 和柱色谱分离法等方法, 本试验方法的操作步骤更为简单, 且对试验环境的要求较低, 能够更加快速的分离出纯度较好、产率较高的卵黏蛋白 (产率和纯度 > 80%)。

2.3 硫酸铵沉淀法去除卵转铁蛋白

选取 4%、5%、6% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 2%、2.5%、3% 的柠檬酸进行正交组合, 根据电泳印迹, 观察卵转铁蛋白分离较好的盐组合, 结果如下:



(a) 上清电泳图



(b) 沉淀电泳图

注:泳道 1: 标记蛋白(170 ku);泳道 2、3、4: 4.0% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 2.0%、2.5%、3.0% 柠檬酸;泳道 5、6、7: 5.0% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 2.0%、2.5%、3.0% 柠檬酸;泳道 8: 6.0% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 2.0%、2.5%、3.0% 柠檬酸。

图 5 卵转铁蛋白沉淀组合电泳图

Fig.5 SDS-PAGE of ovotransferrin precipitation combination

本试验中使用低浓度的硫酸铵和柠檬酸组合沉淀卵转铁蛋白, 来代替酸环境下使用高浓度硫酸铵来沉淀卵白蛋白的分离方法^[20], 能够留下包含着可溶卵白蛋白和卵类黏蛋白的上清液。根据

图 5 中的蛋白印迹, 可以发现, 向上步分离得到的上清液中加入 4.0% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 2.0% 柠檬酸组合后, 能够尽可能的除去卵转铁蛋白, 且不会连带损失过多的卵白蛋白和卵类黏蛋白。柠檬酸的加入

有助于硫酸铵沉淀卵转铁蛋白的原因,可能是柠檬酸的加入降低了蛋清液的 pH 值,接近了卵转铁蛋白的等电点(6.0),使得卵转铁蛋白沉淀分离^[15]。

卵黏蛋白的上清液中加入 4.0%(NH₄)₂SO₄ 和 2.0%柠檬酸来沉淀卵转铁蛋白,为后续卵类黏蛋白和卵白蛋白的分离减少杂蛋白干扰。这种分离方法比其余的方法中所需要的硫酸铵使用量少很多^[2],且咸蛋清中卵转铁蛋白含量少于新鲜鸡蛋中的含量,能够方便有效的除去卵转铁蛋白,在大规模工业化扩大试验中,更为便捷,可以有效降低成本。

2.4 卵白蛋白和卵类黏蛋白的分离

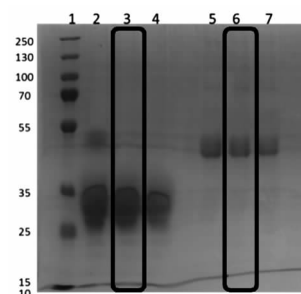
Abeyrathne 等^[15]曾尝试向蛋清液中加入 43% 的乙醇,沉淀除了卵转铁蛋白和卵类黏蛋白以外的大部分蛋白,再向分离得到的上清液中加入高浓度的硫酸铵和柠檬酸组合,逐步分离获得有较高纯度和产率的卵转铁蛋白和卵类黏蛋白。借鉴此方法,向获得的富含卵白蛋白和卵类黏蛋白的上清液中加入无水乙醇,达到分离卵白蛋白和卵类黏蛋白的目的。在 100 g 混合上清液中分别加入 20%,30%,40%的无水乙醇,分析卵白蛋白的分离效果。结果如下:

根据图 6 中的蛋白印迹,可以看到加入终浓度为 20%的乙醇时,上清液中仍有少量的卵白蛋白未能完全分离。而加入终体积分数为 30%和 40%的乙醇后,上清液中无残留卵白蛋白印迹,均可以达到较好的分离效果。根据表 1 中卵白蛋白沉淀的质量,也可以看到加入终体积分数 30%的乙醇后,便可基本沉淀溶液中的卵白蛋白。

因此只需向上一步分离得到的上清液中加入终体积分数为 30%的无水乙醇,便可较好的分离卵类黏蛋白和卵白蛋白,将获得的上清液超滤脱醇脱盐浓缩,冷冻干燥,得到卵类黏蛋白;沉淀多次水洗脱醇脱盐,冷冻干燥,获得的卵白蛋白。Abeyrathne 等^[15]将除去溶菌酶、卵黏蛋白和卵转铁蛋白的蛋清上清液,超滤脱盐浓缩,利用卵白蛋白较好的耐热性,加热沉淀其余蛋白质,以达到分离上清液中卵白蛋白的目的。然而加热沉淀的蛋白质中,含有其它杂蛋白,导致纯度受到一定的影响。相比较而言,本试验方法操作简便,可以较快

表 1 乙醇沉淀卵白蛋白

Table 1 Precipitation of ovalbumin with ethanol		
组号	乙醇终体积分数/%	卵白蛋白/g
1	20	46.46
2	30	58.03
3	40	57.98



注:泳道 1:标记蛋白(250 ku);泳道 2,3,4:用终体积分数 20%,30%,40%的乙醇沉淀卵白蛋白的上清液;泳道 5,6,7:用终浓度 20%,30%,40%的乙醇分离的卵白蛋白。

图 6 卵白蛋白沉淀电泳图

Fig.6 SDS-PAGE of sup-optimization of ovalbumin precipitation

分离纯度较高的卵类黏蛋白和卵白蛋白(纯度分别为 98.5%和 92.7%)。

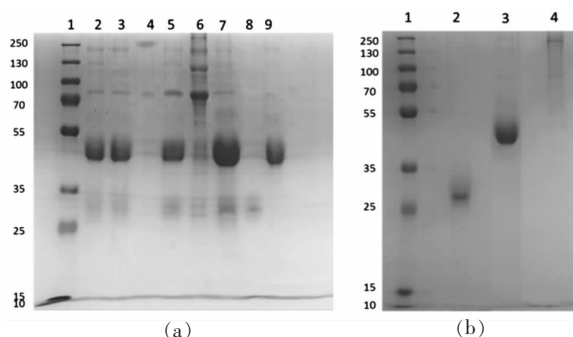
2.5 蛋白分离结果分析

综上,将咸蛋清预处理除去油状物后,先用 HCl 调节蛋清液 pH=5,离心分离沉淀,沉淀用 5 倍水洗后冷冻干燥得到卵黏蛋白;上清液中加入 4.0% (NH₄)₂SO₄ 和 2.0%柠檬酸组合盐沉淀除去卵转铁蛋白,再向上清液中加入终浓度为 30%的无水乙醇,离心后,上清液超滤脱醇脱盐,冷冻干燥得到卵类黏蛋白,沉淀多次水洗后脱醇脱盐,冷冻干燥得到卵白蛋白。

根据表 2 中数据,在实验室规模下,卵类黏蛋白的产率>76%,卵白蛋白的产率>98%,卵黏蛋白的产率>83%。根据图 7 聚丙烯酰胺电泳凝胶印迹显示,卵类黏蛋白和卵白蛋白的蛋白纯度>90%,卵黏蛋白的蛋白纯度>89%。图 7 中可以看到各分离步骤分离效果较好,且冻干样电泳图显示蛋白印迹纯度较高。本试验设计蛋白分离流程基本可以实现从咸蛋清样品中连续分离出产率较高,纯度较好的卵黏蛋白、卵白蛋白和卵类黏蛋白。相较于其它分离方法,本试验方法基于低化学水平,分

表2 蛋白分离结果

蛋白质	蛋白纯度/%	产率/%
卵黏蛋白	89.1	83.81
卵白蛋白	92.7	98.69
卵类黏蛋白	98.5	76.36



注:(a)分离过程电泳图;泳道1:标记蛋白(250 ku);泳道2:咸蛋清;泳道3:除去油状物;泳道4:卵黏蛋白;泳道5:除去卵黏蛋白的上清液;泳道6:卵转铁蛋白;泳道7:除去卵转铁蛋白的上清液;泳道8:卵类黏蛋白;泳道9:卵白蛋白;(b)分离结果冻干样电泳图;泳道1:标记蛋白(250 ku);泳道2:卵类黏蛋白;泳道3:卵白蛋白;泳道4:卵黏蛋白。

图7 蛋白分离电泳图

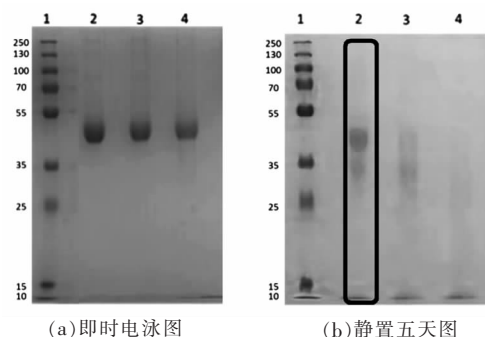
Fig.7 SDS-PAGE of result of protein separation

离方法更加简便,适于扩大规模,应用到工业化生产中。

2.6 醇沉卵白蛋白的复溶

由于醇沉卵白蛋白过程中对蛋白质的亲水基团和氢键等次级键作用有影响,因此尝试在碱条件下复溶卵白蛋白,测试能够使其复溶的最佳条件。结果如下:

从图8a中可以看到调节pH值至12.5,13.0,13.5时,卵白蛋白均能够较好的溶解,复溶液澄清。将复溶液于4℃下静置5d,再次取样电泳,得



注:泳道1:标记蛋白(250 ku);泳道2,3,4:卵白蛋白复溶液 pH=12.5,13.0,13.5(2 mg/mL)。

图8 醇变性卵白蛋白复溶液电泳图

Fig.8 SDS-PAGE of alcohol-denatured ovalbumin redissolution

到图8b,可以看到,pH=13.0和13.5的复溶液发生不同程度的水解,出现拖尾现象,而pH=12.5的复溶液有较好的稳定性,大部分蛋白未被水解。根据张英君对咸蛋清酶解条件的研究^[22],在相同的温度、NaOH浓度下,蛋白质的水解程度随着时间的延长而增加,因此,pH=13.0和13.5的复溶液随着时间的延长,而被逐渐水解;同时在相同的温度、反应时间下,蛋白质的水解程度随NaOH浓度的增大而增大。

因此选择pH=12.5作为醇沉卵白蛋白的复溶条件,便于得到的卵白蛋白的进一步研究。而将pH=12.5的复溶液在溶解后中和回pH=9时,可以延长水解时间。

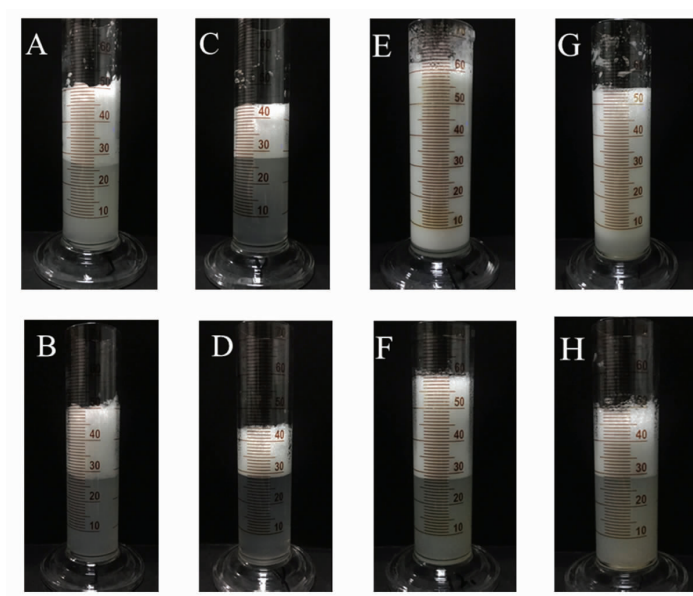
2.7 醇沉卵白蛋白复溶液的起泡性和泡沫稳定性

采用1.3.5节中的方法测定卵白蛋白复溶液的起泡性和泡沫稳定性,并与新鲜鸡蛋蛋清、咸蛋清样品作对照。结果如下:

表3 起泡性(FAI)及泡沫稳定性(FS)对比

Table 3 Comparison of foaming property and foam stability

样品	泡沫体积 V_0 /mL	30 min 后泡沫体积 V_t /mL	FAI/%	FS/%
10%新鲜鸡蛋蛋清	25	23	83.33	92.00
10%咸蛋清	17	13	56.67	76.47
2.5%卵白蛋白(pH=12.5)	61	31	203.33	50.82
2.5%卵白蛋白(pH=9.0)	45	21	150.00	46.67



注:图 A、C、E、G 分别为 10%新鲜鸡蛋蛋清、10%咸蛋清、2.5%卵白蛋白(pH=12.5)、2.5%卵白蛋白(pH=9.0)搅打后泡沫体积;图 B、D、F、H 分别为前图溶液静置 30 min 后泡沫体积。

图 9 卵白蛋白复溶液起泡性

Fig.9 SDS-PAGE of foaming property of ovalbumin redissolution

新鲜鸡蛋清均质后的泡沫,整体泡沫颗粒较大,泡沫表面较硬,可成型,泡沫消泡速度较慢,30 min 后泡沫无较大变化,稳定性较高。咸蛋清均质后的泡沫,泡沫由下向上颗粒逐渐变大,泡沫易破裂,消泡速度较快,30 min 后上层泡沫稀疏,部分破裂,稳定性较差。卵白蛋白复溶液均质后的泡沫,泡沫整体较为绵密,颗粒较小,表面较软,落泡速度快,30 min 后表面部分泡沫破裂,稳定性较差。

根据表 3 和图 9,咸蛋清的起泡性较差或是因为咸蛋清中含盐量较高,会影响蛋白质的溶解度,表面刚性等,对蛋白质的起泡性有抑制作用^[23],同时,咸蛋清中混有残留的脂类,会吸附在泡沫与空气的界面上,导致泡沫因压力不平衡而破裂,蛋白质的起泡性与泡沫稳定性随着蛋白质中脂类含量的增加而线性降低,即呈负相关^[24]。而复溶液的起泡性较好,但是泡沫稳定性较差,是因为蛋清的起泡性主要依赖于卵白蛋白和溶菌酶^[25],泡沫稳定性主要依赖于卵黏蛋白^[26],而复溶液中缺少有高度黏性、在蛋清中能够维持浓厚蛋白稳定性的卵黏蛋白。

3 结论

本试验根据咸蛋清中的蛋白质组成,确定了分离的目标蛋白,利用等电点沉淀、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和柠檬酸沉淀、乙醇沉淀的方法,从咸蛋清中依次连续分离得到卵黏蛋白、卵白蛋白和卵类黏蛋白。在实验室规模下,卵类黏蛋白的产率>76%,卵白蛋白的产率>90%,卵黏蛋白的产率>89%。根据聚丙烯酰胺电泳凝胶印迹显示,卵类黏蛋白和卵白蛋白的蛋白纯度>90%,卵黏蛋白的蛋白纯度>89%。通过蛋白分离流程获得的变性卵白蛋白冷冻干燥粉,可于 pH=12.5 下有较好的溶解性,且该卵白蛋白的复溶液具有较好的起泡性。希望能够为工厂化等大规模咸蛋清处理提供新的思路,有效提高咸蛋清的利用率,减少蛋品资源的大量浪费。

参 考 文 献

- [1] JIANG B, NA J X, WANG L L, et al. Reutilization of food waste: One-step extraction, purification and characterization of ovalbumin from salted egg white by aqueous two-phase flotation [J]. *Foods* (Basel, Switzerland), 2019, 8(8): 286.

- [2] 管沛清, 程裕东, 金银哲. 咸鸭蛋快速腌制工艺及咸蛋清综合利用研究进展[J]. 食品与机械, 2020, 36(10): 210-214.
ZAN P Q, CHENG Y D, JIN Y Z. Research progress on rapid pickling process of salted duck eggs and comprehensive utilization of salted duck egg white[J]. Food & Machinery, 2020, 36(10): 210-214.
- [3] 李逢振. 咸蛋清资源化综合利用的研究[J]. 农产品加工, 2020(3): 85-86, 90.
LI F Z. Study on the comprehensive utilization of salted egg white[J]. Farm Products Processing, 2020(3): 85-86, 90.
- [4] 肖功年, 王柳雄, 袁海娜, 等. 不同因素对咸鸭蛋蛋清日本豆腐质构特性的影响[J]. 中国食品学报, 2013, 13(10): 38-42.
XIAO G N, WANG, L X, YUAN H N, et al. Effect of different factors on the textural properties of salted duck egg white Japanese Tofu[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(10): 38-42.
- [5] TAN T C, PHATTHANAWIBOON T, EASA A M. Quality, textural, and sensory properties of yellow alkaline noodles formulated with salted duck egg white [J]. Journal of Food Quality, 2016, 39(4): 342-350.
- [6] 王智云, 钟声涛, 郭思浩, 等. 咸蛋清鸡肉糜生产工艺研究[J]. 农产品加工, 2019, 18(9): 36-38, 42.
WANG Z Y, ZHONG S T, GUO S H, et al. Study on the production technology of salted egg white chicken[J]. Farm Products Processing, 2019, 18(9): 36-38, 42.
- [7] 周钦育, 黄燕燕, 赵珊, 等. 蛋清溶菌酶的提取及其酶学性质探究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(4): 148-158.
ZHOU Q Y, HUANG Y Y, ZHAO S, et al. Studies on extraction and enzymatic properties of egg white lysozyme [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(4): 148-158.
- [8] 陈栋梁, 刘莉, 唐良艳, 等. 卵清蛋白肽对小鼠机体的免疫增强作用[J]. 食品科技, 2007, 32(1): 219-223.
CHEN D L, LIU L, TANG L Y, et al. Enhancement immune function of ovalbumin peptide in mice [J]. Food Science and Technology, 2007, 32(1): 219-223.
- [9] TANIA M, SANDRA J M, RAYMOND J P. Protease inhibitors protect bovine colostrum or chicken egg growth factors from pancreatic enzyme digestion in ags cells or colitic rats[J]. The Journal of Nutrition, 2021, 151(10), 3036-3044.
- [10] SUN X, CHAKRABARTI S, FANG J, et al. Low-molecular-weight fractions of alcalase hydrolyzed egg ovomucin extract exert anti-inflammatory activity in human dermal fibroblasts through the inhibition of tumor necrosis factor-mediated nuclear factor kappaB pathway[J]. Nutrition Research, 2016, 36(7): 648-657.
- [11] 崔春, 赵谋明, 冯琬贞, 等. 利用咸蛋清制备溶菌酶, 呈味基料及蛋黄油的方法: CN102978186 B[P]. 2013-03-20.
CUI C, ZHAO M M, FENG W Z, et al. Preparation of lysozyme, flavouring base and egg yolk oil from salted egg whites: CN102978186 B[P]. 2013-03-20.
- [12] YANG C C, CHEN C C, CHANG H M. Separation of egg white lysozyme by anionic polysaccharides[J]. Journal of Food Science, 1998, 63(6): 962-965.
- [13] DING Z Y, LI S P, CAO X J. Separation of lysozyme from salted duck egg white by affinity precipitation using pH-responsive polymer with an L-thyroxin ligand[J]. Separation and Purification Technology, 2014, 138(10): 153-160.
- [14] ABEYRATHNE E, LEE H Y, AHN D U. Sequential separation of lysozyme, ovomucin, ovotransferrin, and ovalbumin from egg white[J]. Poultry Science, 2014, 93(4): 1001.
- [15] ABEYRATHNE E D, LEE H Y, AHN D U. Separation of ovotransferrin and ovomucoid from chicken egg white[J]. Poultry Science, 2014, 93(4): 1010-1017.
- [16] TANABE S, TESAKI S, WATANABE M. Producing a low ovomucoid egg white preparation by precipitation with aqueous ethanol [J]. Biosci. Biotechnol. Biochem, 2000, 64(9): 2005-2007.
- [17] 史晓霞. 蛋清卵类粘蛋白分离纯化、结构表征及其过敏原性的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
SHI X X. Study on the isolation and purification, structural characterization and allergenicity of chicken egg white ovomucoid[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012.

- [18] AN Y, CUI B, WANG Y, et al. Functional properties of ovalbumin glycosylated with carboxymethyl cellulose of different substitution degree[J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 40: 1–8.
- [19] 张立斌, 陈小侠, 吴汉东. 鸡蛋清卵粘蛋白分离工艺研究[J]. *饲料研究*, 2017, 5(7): 27–29, 43.
ZHANG L B, CHEN X X, WU H D. Study on the separation process of egg white mucin[J]. *Feed Research*, 2017, 5(7): 27–29, 43.
- [20] WARNER R C, WEBER I. The preparation of crystalline conalbumin[J]. *J Biol Chem*, 1951, 191(1): 173–180.
- [21] 贺娟妮. 鸡蛋中功能蛋白质和活性肽的研究现状[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(15): 210–213.
HE J N. Advance of research on functional proteins and bioactive peptides in egg[J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(15): 210–213.
- [22] 张英君. 脱盐咸鸭蛋蛋清的水解规律研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2001.
ZHANG Y J. Study on the hydrolysis pattern of desalted salted duck egg white[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2001.
- [23] SHENG L, WANG Y, CHEN J, et al. Influence of high-intensity ultrasound on foaming and structural properties of egg white[J]. *Food Research International*, 2018, 108: 604–610.
- [24] 王彦蓉, 卢苙虹, 崔春, 等. 不同方式处理对咸蛋清蛋白起泡力的研究[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(8): 121–122, 247.
WANG Y R, LU J H, CUI C, et al. Effect of different treatments on improving foaming properties of salty egg white[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2010, 31(8): 121–122, 247.
- [25] FLOCH-FOUÉR C L, PEZENNEC S, LECHEVALIER V, et al. Synergy between ovalbumin and lysozyme leads to non-additive interfacial and foaming properties of mixtures [J]. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23(2): 352–365.
- [26] CHEN Y, SHENG L, GOUDA M, et al. Impact of ultrasound treatment on the foaming and physico-chemical properties of egg white during cold storage [J]. *LWT*, 2019, 113: 108303.

Extraction and Purification of Several Important Proteins in Salted Egg White

Bai Jing, Ji Shengnan, Zou Jie, Huang Xi*

(National Research and Development Center for Egg Processing, College of Food Science and Technology of Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract Salted egg white is a by-product of egg yolk processing. In order to improve its utilization rate, a simple, feasible and low-cost process for continuous separation of several important proteins in salted egg white was established in this study. Ovomucin, ovalbumin and ovomucoid were isolated from salted egg white by isoelectric point precipitation, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ salting out and alcohol precipitation. The results showed that the yields of ovomucin, ovalbumin and ovomucoid were 83%, 98% and 76%, respectively, at laboratory scale. SDS-PAGE gel electrophoresis showed that the purities of the three proteins were 89%, 92% and 98%, respectively. In addition, the ovalbumin separated by alcohol precipitation still had good foaming property after redissolution, indicating that the separation method could maintain the functional properties of the protein well.

Keywords salted egg white; protein; continuous separation; protein purification; functional properties