

柳聪, 周欣, 罗进旭, 等. 绿色高效连续分离技术制备蛋黄中活性蛋白质和磷脂 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(1): 180-187. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040149

LIU Cong, ZHOU Xin, LUO Jinxu, et al. Active Proteins and Phospholipids Prepared from Chicken Egg Yolk by Green and Efficient Sequential Separation Technology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(1): 180-187. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040149

绿色高效连续分离技术制备蛋黄中 活性蛋白质和磷脂

柳 聪¹, 周 欣¹, 罗进旭¹, 夏民权¹, 李小萌¹, 王 晨², 蔡朝霞^{1,2,*}

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 教育部环境食品学重点实验室, 蛋品加工技术国家地方联合工程研究中心, 湖北武汉 430070;

2. 高邮市秦邮蛋品有限公司, 江苏扬州 225000)

摘 要: 为了实现蛋黄功能性成分的充分利用, 采用绿色溶剂从新鲜蛋黄中高效连续分离具有生物活性的卵黄免疫球蛋白 (immunoglobulin Y, IgY)、卵黄高磷蛋白 (phosvitin, PV) 和磷脂 (phospholipids, PL)。首先采用水稀释法 (稀释倍数为 1:10) 分离水溶性组分与脂蛋白, 通过 35% 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 0.5% NaCl (w/v) 对上清液进行盐析并用 8% PEG 6000 纯化 IgY。脂质组分中的 PV 在 pH5.0, 90 °C 条件下的 NaCl 溶液 (w/v) 中进一步纯化。采用乙醇/乙酸乙酯比例为 1:2 (v/v) 提取蛋黄中全部脂类, 进一步采用乙酸乙酯在 0 °C 下提纯蛋黄总脂中的 PL。经脱盐、冷冻干燥后, IgY、PV 和 PL 的纯度分别为 97.38%、78.63% 和 85.94%。IgY 和 PV 的得率分别为 6.15、10.15 mg/mL。蛋黄总脂中 PL 的含量为 35.18%。因其良好的多不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸比率 (0.70) 和相对较低的 n-6/n-3 比率 (5.37), 该 PL 产品可应用于食品加工中。本方法简便、环保并且高效, 可从蛋黄中依次分离出高纯度 IgY、PV 和 PL, 并为蛋黄的综合利用提供技术支持。

关键词: 蛋黄, 生物活性成分, 联合提取, 乙酸乙酯萃取, 脂肪酸

中图分类号: TS253

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)01-0180-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040149



本文网刊:

Active Proteins and Phospholipids Prepared from Chicken Egg Yolk by Green and Efficient Sequential Separation Technology

LIU Cong¹, ZHOU Xin¹, LUO Jinxu¹, XIA Minquan¹, LI Xiaomeng¹, WANG Chen², CAI Zhaoxia^{1,2,*}

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education, National and Local Joint Engineering Research Center for

Egg Processing Technology, Wuhan 430070, China;

2. Gaoyou Qinyou Egg Products Co., Ltd., Yangzhou 225000, China)

Abstract: In order to achieve the full utilization of the functional components of egg yolk, a green solvent was used to separate bioactive immunoglobulin Y (IgY), phosvitin (PV), and phospholipids (PL) from fresh chicken egg yolk efficiently and continuously. Firstly, the water-soluble fraction was separated from the lipoproteins by water dilution (dilution ratio of 1:10), and the supernatant was salted by 35% saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 0.5% NaCl (w/v) and IgY purified by 8% PEG 6000. The PV in the lipid fraction was further purified in NaCl solution (w/v) at pH5.0, 90 °C. All lipids in egg yolk were extracted using an ethanol/ethyl acetate ratio of 1:2 (v/v), and PL in total egg yolk lipid was further purified using ethyl acetate at 0 °C. After desalting and freeze-drying, the purity of IgY, PV and PL was 97.38%, 78.63% and 85.94%, respectively. The yield of IgY and PV was 6.15 mg/mL egg yolk and 10.15 mg/mL egg yolk, respectively, and the content of PL in lipids accounted for 35.18%. The PL product may be served as a good source of dietetic applications due to its favorable PUFA/SFA ratio (0.70) and comparable lower n-6/n-3 ratio (5.37). These results proved that IgY, PV and PL can be purified

收稿日期: 2021-04-15

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (2662020SPPY005); 湖北省杰出青年基金项目 (2018CFA073)。

作者简介: 柳聪 (1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 蛋品科学与工程, E-mail: 1820623992@qq.com。

* 通信作者: 蔡朝霞 (1979-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 蛋品科学与工程, E-mail: caizhaoxia@mail.hzau.edu.cn。

in sequence from egg yolk with high purity. Also, this method is very simple, environment friendly and can provide technical support for the comprehensive utilization of egg yolk.

Key words: egg yolk; bioactive components; co-extraction; ethyl acetate extraction; fatty acids

我国是禽蛋生产和消费大国,禽蛋产量占世界总产量的 40% 以上,已连续多年居世界第一。禽蛋是人类优质蛋白质和脂质摄取的重要来源,具有营养丰富、配比均衡、价廉易得等优点,尤其是蛋黄中富含卵黄免疫球蛋白(immunoglobulin Y, IgY)、卵黄高磷蛋白(phosvitin, PV)、磷脂(phospholipids, PL)等功能活性组分。IgY 的结构和功能均与哺乳动物免疫球蛋白(immunoglobulin G, IgG)相似,可通过特异性抗原免疫鸡以产生特异性 IgY 来对抗多种疾病^[1],且在药物、功能性食品和食品保藏等领域均有重要应用^[2-3]。PV 是蛋黄中主要的磷酸化蛋白,含有 30%~50% 的磷酸化丝氨酸,具有良好的表面活性^[4-5]、抗氧化活性、抗癌活性和抗菌活性, PV 因其高附加值而被广泛用于化妆品、营养品、食品和制药工业^[6]。PL 约占蛋黄油脂总量的 33%,主要由 80.5% 磷脂酰胆碱(phosphatidyl choline, PC)和 11.7% 磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PE)组成,被广泛用作营养补充剂,以及食品、药物和化妆品行业中的高效乳化剂和润滑剂^[7-9]。

蛋黄是禽蛋中营养丰富的组分,具有高蛋白和高脂质的特点,蛋白和脂质分布在浆质和颗粒中。浆质中含有 85% 的低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)和 15% 的 IgY^[4]。颗粒中有 70% 的高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)和 16% 的 PV,它们通过磷钙桥连接。从鲜蛋黄中分离和纯化 IgY 的主要障碍是存在不溶于水的成分,如脂蛋白^[10]。蛋黄中磷脂含量较高,占蛋黄质量的 16%,在 IgY 分离过程中可自发形成双层纳米囊泡^[11-12],是 IgY 纯化步骤的主要障碍之一,为了解决这一问题,可采用水稀释法进行分离^[13-14]。目前最常用的方法有卡拉胶^[10,15]、辛酸^[16]、酸性蒸馏水稀释^[17],卡拉胶的去脂效果较好,但对蛋黄颗粒部分的物质提取有影响,不利于蛋黄的综合利用。REN 等^[18]比较了各种方法对 IgY 的提取效果,认为酸性条件下的水稀释法是一种绿色环保、极具成本效益的方法。亲和色谱法和离子交换色谱法可获得高纯度、低得率的 IgY^[19-21]。另外,单一沉淀剂如聚乙二醇^[22]和硫酸铵^[10,19]已用于进一步纯化 IgY。尽管在这些条件下得率很高, IgY 的纯度约为 80%。经过进一步的研究,硫酸铵和氯化钠共同使用可以使 IgY 的纯度提高到 90%^[23]。PV 主要以高密度脂蛋白-卵黄高磷蛋白复合物的形式存在于不溶性组分中。己烷、氯仿、乙醚等^[24-25]可提取蛋黄中残留的脂质,但有机溶剂残留等问题难以解决,进而限制其应用范围^[26]。为了进一步纯化 PV,采用 NaCl 从蛋白混合物中释放 PV,后调节 pH 并加热^[27-29]。传统的 PL 提取方法有很多缺点,

超临界二氧化碳萃取法和亚临界丙烷萃取法已广泛应用于去除中性脂质以获得 PL,这些方法不仅昂贵、难以大规模生产且产品纯度很低^[30-32]。目前的研究多集中在丙酮、石油醚、氯仿等多溶剂萃取体系上,但残留的有毒化学试剂对人体有潜在危害^[33]。最近, WANG 等^[9]发现用乙醇制得的 PL 纯度和得率均较高。对蛋黄的单一蛋白或脂质组分进行分离纯化普遍存在副产物多、原料利用率低等问题,造成了极大的浪费,而采用绿色高效的方法对蛋黄中多种活性物质进行联合提取可有效避免此类问题并提高蛋制品的附加值。

本文主要研究蛋黄中活性蛋白质和磷脂的提取工艺,拟开发一种使用绿色溶剂联合提取 IgY、PV 和 PL 的方法,同时避免使用非食品级溶剂,能够工业化生产,实现蛋黄功能性成分的充分利用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鸡蛋 湖北省武汉市洪山区九峰新跃养鸡场提供; PEG 6000 分析纯,上海默克化学有限公司;正己烷 色谱纯,国药集团化学试剂有限公司;考马斯亮蓝 R250、考马斯亮蓝 G250 武汉市谷歌生物有限公司;标准 IgY、PV、PC、PE 美国 Sigma 公司; Toyopearl DEAE-650M 填料 日本 TOSOH 公司;所有分离用试剂 均为国产分析纯。

3-30K 离心机 德国 Sigma 公司; Alpha1-4LD 冷冻干燥机 德国 Marin Christ 公司; Waters 2695 高效液相色谱仪 美国 Waters 公司; TSK-GEL G2000SWXLcolume 凝胶色谱柱 日本 TOSOH 公司; Gel DOC 2000 凝胶成像系统 美国 BIO-RAD 公司; Agilent 7890B 气相色谱仪、Agilent 5977A 质量选择检测器、DB-23 毛细管柱 加拿大 Agilent 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋黄生物活性化合物提取、纯化工艺

1.2.1.1 工艺流程 先将蛋黄用 4 ℃ 去离子水稀释,离心后得到水溶性组分(water soluble fraction, WSF)和脂蛋白。首先通过盐析从 WSF 提取 IgY,并用 PEG 6000 进一步纯化。其次,用乙醇从脂蛋白中提取蛋黄油;剩余的沉淀物为 PV 和一些脂质。用乙醇和乙酸乙酯作为复合溶剂,分离 PV 和脂类。最后,将所有蛋黄油收集在一起。再加入乙酸乙酯进一步提取 PL。提取纯化工艺流程如图 1 所示。

1.2.1.2 IgY 的提取与纯化 分别将蛋黄用 6、7、8、9、10、11 倍体积的 4 ℃ 去离子水稀释,并用 1 mol/L HCl 将 pH 调至 5.5,在 4 ℃ 条件下保存过夜,经

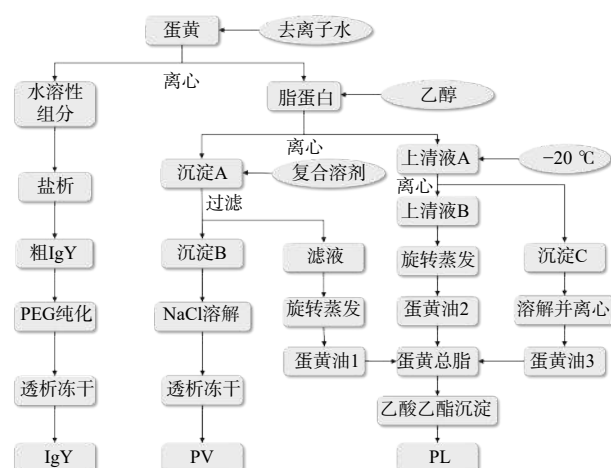


图1 纯化工艺流程

Fig.1 Scheme of the purification process

10000 r/min, 4 ℃ 离心 15 min 后得到 WSF(上清液)和脂蛋白(沉淀)。采用 Bradford 法测定 WSF 中蛋白质含量。先向 WSF 中加入固定浓度(1.0%)的 NaCl 和不同饱和度(30%、35%、40%、45%、50%)的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 优化出最佳饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 后通过最适饱和度(35%)的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和不同浓度(0.5%、1.0%、1.5%、2.0%)的 NaCl 得到最佳的 IgY 分离条件。在 4 ℃ 下 8000 r/min 离心 15 min 后收集沉淀物, 用 10 倍体积的去离子水溶解。通过不同浓度(8%、10%、12%、14%)的 PEG 6000 再次使悬浮液沉淀, 以提高纯度。在 4 ℃、8000 r/min 离心 15 min 后, 收集沉淀物并用去离子水溶解, 放入 8~14 kDa 透析袋中透析脱盐, 后进行冷冻干燥。

1.2.1.3 PV 的提取与纯化 将 1.2.1.2 中的脂蛋白与乙醇以 0.8(w/v)的比例均质 5 min, 并在 4 ℃ 下 10000 r/min 离心 10 min。分别收集沉淀物 A 和上清液 A。将沉淀物 A 与助溶剂(乙醇:乙酸乙酯=2:1, v/v)以 1:9(w/v)的比例混合, 然后在 30 ℃ 条件下磁力搅拌 90 min。通过 Whatman 滤纸过滤混合溶液, 得到沉淀物 B, 所得滤液为残留的蛋黄油。将沉淀物 B 以 1:10(w/v)的比例悬浮在 10% NaCl 中, 将悬浮液分成等分试样。分别将试样调节 pH 至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0, 在 90 ℃ 下磁力搅拌 30 min, 优化出最佳 pH; 后将试样在最适 pH 5.0 和不同温度(70、75、80、85、90、95 ℃)条件下磁力搅拌 30 min, 得到最佳的 PV 分离条件。10000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 通过透析脱盐, 冷冻干燥后分离出 PV。

1.2.1.4 蛋黄油的提取 用乙醇和乙酸乙酯以不同比例(乙醇/乙酸乙酯, v/v=1:0.5、1:1、1:2、1:3、1:4)处理沉淀 A, 确定复合溶剂(乙醇和乙酸乙酯)的比例后, 沉淀 A 与复合溶剂的添加量在 1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11(w/v)范围内优化。将混合物在 20 ℃ 下磁力搅拌 90 min。过滤悬浮液, 在 45 ℃ 下旋转蒸发滤液, 除去乙醇和乙酸乙酯后得到蛋黄

油 1。同时, 将乙醇提取的馏分上清液 A 在 -20 ℃ 结晶 3 h, 然后在 4 ℃ 于 4000 r/min 离心 2 min 后分离出上清液 B 和沉淀 C。提取的乙醇馏分(上清液 B)包含蛋黄油的主要部分, 通过旋转蒸发(40 ℃)除去乙醇, 收集蛋黄油 2。将剩余蛋白和部分蛋黄油组成的沉淀 C 转移到 30 ℃ 中水浴 10 min, 在 4 ℃ 下 4000 r/min 离心 2 min 得到蛋黄油 3。将多个提取过程得到的油脂收集在一起即为蛋黄总脂, 对冷冻干燥的脂质进行进一步分析。

1.2.1.5 PL 的提取 将 1.2.1.4 中获得的总蛋黄油溶解于不同体积(w/v=1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7)的乙酸乙酯中, 并在不同温度(0、4、-20 ℃)结晶 2 h。在 4 ℃ 下 4000 r/min 离心 2 min 后收集沉淀物, 冷冻干燥。

1.2.2 SDS-PAGE 分析 采用周欣^[34]的实验方法, 通过 SDS-PAGE 分析所得 IgY 和 PV 样品。具体条件为: 12% 分离胶, 4% 浓缩胶, pH 为 8.6 的 Tris-glycine 电极缓冲液。当样品在 80 V 电压下迁移到浓缩胶和分离胶界面时, 调节电压至 120 V, 直至样品移动至底部。电泳完成后, 取出胶, 使其在固定液(冰醋酸/乙醇/水, v/v/v=1/5/4)中固定 30 min, 随后用考马斯亮蓝 R-250 染色 30 min, 最后使用脱色液(冰醋酸/乙醇/水, v/v/v=8/25/67)脱色, 每小时换一次脱色液, 脱色 4~5 次至凝胶背景颜色褪成无色。

1.2.3 纯度测定 采用美国 Waters 2695 高效液相色谱仪, 用 SEC-HPLC 法测定 PV 和 IgY 的纯度。样品用流动相溶解, 使浓度达到 1 mg/mL。用 TSK-GEL G2000SWXL 柱在含有 0.2 mol/L NaCl(pH7.0)的 0.1 mol/L PBS 中于 214 nm 处检测分析 PV 的纯度。通过 TSK-GEL G3000SWXL 柱在含 0.05% NaN_3 、0.1 mol/L Na_2SO_4 (pH6.6)的 0.1 mol/L PBS 中以 0.9 mL/min 的速度于 280 nm 处检测分析 IgY 的纯度。高效液相色谱中 IgY 和 PV 峰面积占总峰面积的百分比即为 IgY 和 PV 的纯度。PL 纯度测定参见 GB/T 5537-2008 中钼蓝比色法。

1.2.4 得率和产率的测定 IgY 和 PV 的得率为最终样品冷冻干燥后总质量与原料蛋黄体积之比。蛋黄油产率为最终得到蛋黄油质量与咸蛋黄中理论蛋黄油质量之比。具体计算公式如下:

得率(mg/mL 蛋黄)=最终样品冷冻干燥后总质量/原料蛋黄体积

$$\text{蛋黄油产率(\%)} = \frac{\text{蛋黄油的质量}}{\text{鲜蛋黄的质量} \times 0.34} \times 100$$

$$\text{蛋黄总脂中PL的含量(\%)} = \frac{\text{磷脂的质量}}{\text{蛋黄总脂的质量}} \times 100$$

式中: 0.34 为蛋黄中蛋黄油的理论量^[35]。

1.2.5 脂肪酸成分分析 精确称取 20 mg 油样于 10 mL 具塞试管, 加入 4 mL NaOH-MeOH(0.1 mol/L)溶液, 通入氮气后密封, 涡流振荡 15 s 后于 65 ℃ 水

浴皂化 40 min 至油滴消失,冷却后加入 3 mL $\text{BF}_3\text{-MeOH}$ (14%)溶液,65 °C 加热 20 min。流动水冷却,加入 2 mL 正己烷和 2 mL 0.88% NaCl 溶液,涡旋 15 s,3000 r/min 离心 5 min。取正己烷(AR)层,加少量无水硫酸钠吸收残余水分,氮气浓缩后用 1 mL 正己烷复溶,0.22 μm 滤膜过滤后进行 GC-MS 分析。

进样口温度 250 °C,MS 检测器温度 280 °C,分流比 10:1,进样体积 1 μL 。升温程序:150 °C 保持 0 min,以 10 °C/min 升温至 230 °C 并保持 15 min。离子源温度 230 °C,接口温度 250 °C,溶剂延迟时间 2.5 min,开始时间 3.0 min,结束时间 60.0 min。脂肪酸相对含量的确定采用面积归一化法计算。

1.2.6 薄层色谱分析 蛋黄 PL 提取物中含有 PC、PE 和少量脂肪等多种成分,参考刘颖等^[36]的方法采用薄层层析法能够有效地鉴定蛋黄 PL 的成分。展开剂配比为 V(氯仿):V(甲醇):V(水)=65:25:4。取硅胶 G 板活化、密闭冷却、点样、展开,展开 10 cm 左右,取出吹干,碘蒸气显色。

1.3 数据处理

采用 Microsoft Excel 2010 分析数据。使用 SAS 9.1 软件通过单因素方差分析(ANOVA)比较平均值之间的差异。 $P<0.05$ 时具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 IgY 的提取与纯化

采用水稀释法对 IgY 进行粗提取。如图 2 所示,当稀释倍数达到 1:10 时,蛋白质含量的上升趋势减缓,可能是因为 IgY 为可溶性蛋白,其表面具有较多的亲水基团,当其与水接触后会迅速吸水溶解,在稀释倍数为 1:10 时大多数可溶性蛋白质已被水溶解完全,少数处于蛋黄颗粒部分的蛋白质难以溶解,故蛋白质含量上升减缓。

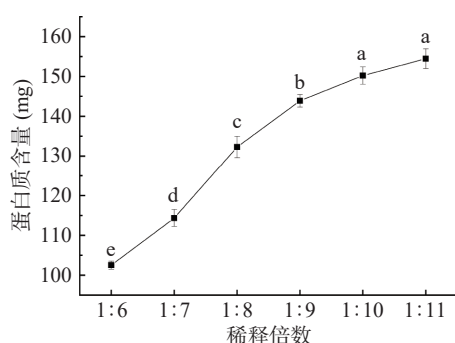


图 2 水稀释倍数对 WSF 中蛋白质含量的影响

Fig.2 Effect of dilution times on the content of proteins in WSF

注:对于同一指标,不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);图 3、图 6、图 7 同。

IgY 是一种水溶性蛋白质,常用盐析法从 WSF 中提取。当单独使用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 时,上清液中仍有大量 IgY^[19]。对不同浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NaCl 组合对 IgY 粗提效率的影响进行了分析。如图 3A

所示,当 NaCl 浓度为 1.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的浓度由 30% 增加到 50% 时,提取过程中 IgY 的纯度显著下降($P<0.05$),而得率则呈相反趋势。图 3B 显示,1.0% NaCl 与固定浓度(35% 饱和度) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 相结合时,IgY 的纯度最低。而当 NaCl 浓度增加至 1.0%(w/v)时,IgY 的得率最高。之后随着 NaCl 浓度的增加,IgY 的得率缓慢下降。这一现象可能是由于高盐浓度下其他蛋白质的共沉淀作用导致的,这与 AKITA 等^[17]的结果一致。综合考虑纯度和得率,选择 35% 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 0.5% NaCl(w/v)组合从蛋黄中粗提 IgY。有研究表明在 20% 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 15% NaCl(w/v)条件下,IgY 的纯度和产率分别提高到 98.7% 和 80.9%。NaCl 浓度为 0.16 mol/L(0.94%)~1.5 mol/L(8.8%)时,浆质蛋白抑制了蛋黄颗粒的分离效果,加入高浓度的 NaCl 有利于 IgY 的沉淀^[23],而本研究在提取 IgY 过程中 NaCl 的使用量大大降低。

采用 PEG 6000(w/v)纯化 IgY 的结果如图 3C

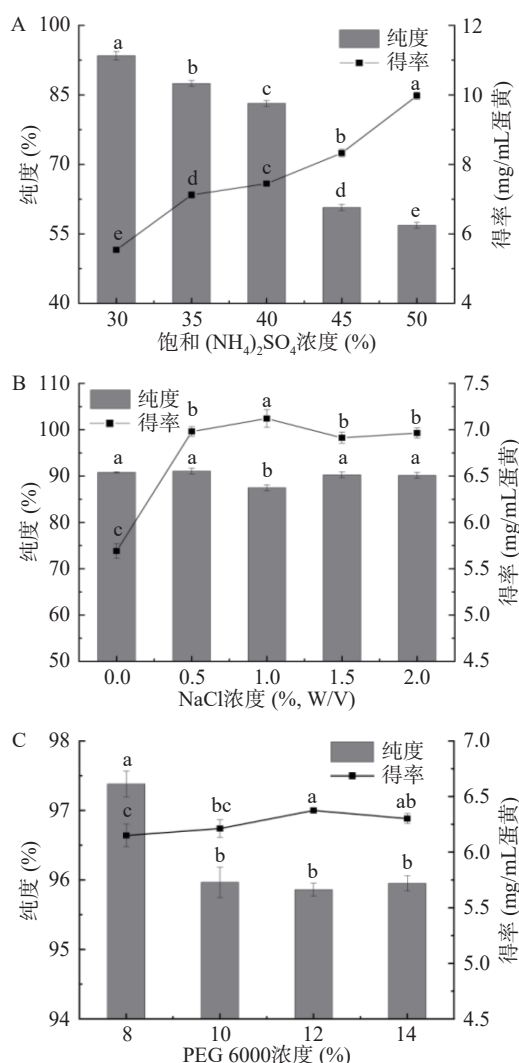


图 3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度(A)和 NaCl 浓度(B)、PEG 6000 浓度(C)对 IgY 纯度和得率的影响

Fig.3 Effect of the concentrations of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (A), NaCl (B) and PEG 6000 (C) on the purity and yield of IgY

所示。当 PEG 6000 浓度为 8% 时, IgY 的纯度最高, 得率最低, 纯度和得率分别为 97.38% 和 6.15 mg/mL 蛋黄。由图 4A 可以看出, 在用 35% (NH₄)₂SO₄ 和 1.0% 氯化钠(w/v)沉淀后, 泳道 3 中在 33 kDa 附近仍然存在大量蛋白质, 但用 8% PEG 6000(w/v)进一步处理后, 泳道 4 中的杂蛋白明显减少, 表明 PEG 6000 有助于 IgY 的有效分离。HPLC 结果(图 4B)显示, 盐析后 IgY 的纯度为 87.46%, 经过 PEG 沉淀后纯度提高到 97.38%, 表明盐析和 PEG 的组合可有效纯化 IgY。

2.2 PV 的提取条件选择

沉淀物 B 中 PV 主要通过磷钙桥以卵黄高磷蛋白-高密度脂蛋白复合物的形式存在^[7]。10% (w/v) NaCl 通常用于破坏 HDL 和 PV 之间的磷钙桥^[28,37]。本文研究了 pH 对 PV 提取的影响。结果如表 1 所示, 在 pH5.0 条件下, 分离效果最好(PV 纯度为 78.63%±0.88%, 得率为 10.17±0.29 mg/mL), 这与 REN 等^[38]的研究结果一致。当 pH 为 5.0 时, 部分 HDL 析出, 而 PV 仍存在于上清液中。随着 pH 逐渐升高, 偏离等电点, 分子间静电斥力增加, 溶解度升高, 故上清液中 HDL 含量增加, 使得 PV 的分离效果下降。

PV 有较好的耐热性, 极易溶于水, 因此将盐析和加热处理结合可提高其纯度^[27,37]。由表 1 可知, 当温度从 70 ℃ 升至 80 ℃, PV 纯度由 66.47%±4.01%

表 1 pH 和温度对 PV 纯度的影响

Table 1 Effects of pH and temperature on the purification of PV

因素	水平	纯度(%)	得率(mg/mL)
pH	4.0	74.86±0.08 ^b	10.70±0.09 ^c
	5.0	78.63±0.88 ^a	10.17±0.29 ^d
	6.0	67.37±0.40 ^d	11.75±0.13 ^a
	7.0	66.44±2.76 ^d	11.90±0.37 ^a
	8.0	69.96±0.45 ^c	11.32±0.62 ^b
	70	66.47±4.01 ^c	12.71±0.22 ^a
温度(℃)	75	69.36±0.36 ^b	11.92±0.91 ^b
	80	78.08±0.16 ^a	10.30±0.06 ^c
	85	77.87±1.72 ^a	10.02±0.83 ^c
	90	78.72±1.02 ^a	10.14±0.29 ^c
	95	78.11±0.09 ^a	9.85±0.46 ^c

注: 同列不同小写字母表示同一指标差异显著($P<0.05$)。

显著提高到 78.08%±0.16% ($P<0.05$)。而随着温度由 80 ℃ 升至 95 ℃, PV 纯度保持稳定, 90 ℃ 时 PV 的纯度最高。主要是因为随温度升高, 部分杂蛋白逐渐变性析出, 从而提高了 PV 纯度。

由图 5A 可以看出, 泳道 2 上的 PV 样品与泳道 1 上的 PV 标准品基本一致, 与 JIANG 等^[38]的结果一致。经过 HPLC 分析(图 5B), 所得 PV 的纯度为 78.72%, 得率为 10.14 mg/mL。

2.3 蛋黄油的提取条件选择

鉴于蛋黄油由极性脂质和非极性脂质组成, 因

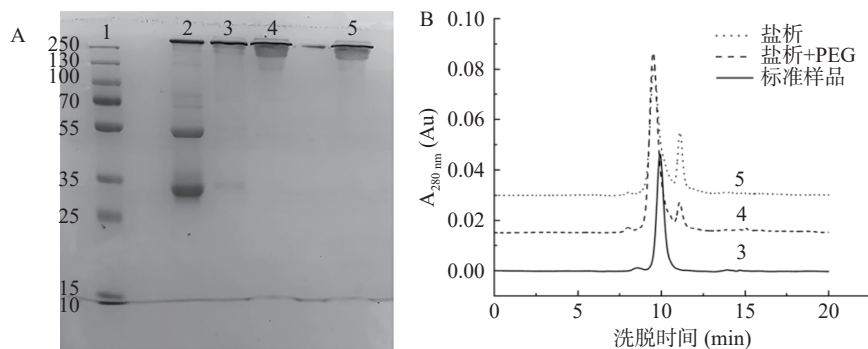


图 4 纯化 IgY 样品的 SDS-PAGE 图谱(A)和 HPLC 图谱(B)

Fig.4 Diagram of SDS-PAGE (A) and HPLC (B) of purified IgY sample

注: 1: Marker; 2: WSF; 3: 盐析处理后的 IgY; 4: 盐析+PEG 6000 处理后的 IgY; 5: IgY 标准样品。

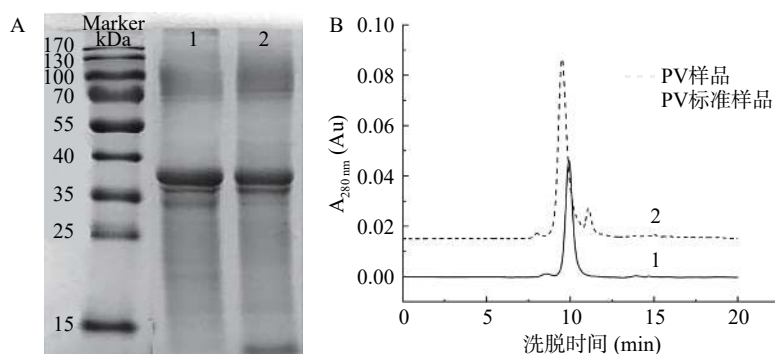


图 5 纯化 PV 样品的 SDS-PAGE 图谱(A)和 HPLC 图谱(B)

Fig.5 Diagram of SDS-PAGE (A) and HPLC (B) of purified PV sample

注: 1: PV 标准样品; 2: PV 样品。

此本研究选择极性和非极性溶剂(乙醇/乙酸乙酯)的组合来更好地提取沉淀 A 中的剩余脂质。图 6A 表明,乙醇/乙酸乙酯比例为 1:2(v/v)时产率最高,主要原因是蛋黄油含有约 62% 的中性脂质和 33% 的极性脂质^[39]。据相似相溶原理,中性脂质在乙酸乙酯中有较好的溶解性,而 PL 较易溶于乙醇溶液中,因此当乙醇与乙酸乙酯的比例达到 1:2 时,恰好与蛋黄油中中性脂质与极性脂质的比例相同,从而使蛋黄油的产率达到最大。如图 6B 所示,在相同的添加量下,通过乙醇溶剂提取的蛋黄油的产率明显低于复合溶剂。在最佳条件下,本研究中蛋黄油产率最高为 88.09%,得率为 30.10 mg/mL,高于 NIELSEN 用乙醇提取所得结果^[40],表明新型混合溶剂乙醇/乙酸乙酯具有较高的提取效率。KOVALCUKS 等^[41]采用溶剂混合物乙醇/氯仿和 2-丙醇/己烷进行蛋黄油的提取,得率分别为 29.91 mg/mL 和 27.29 mg/mL。

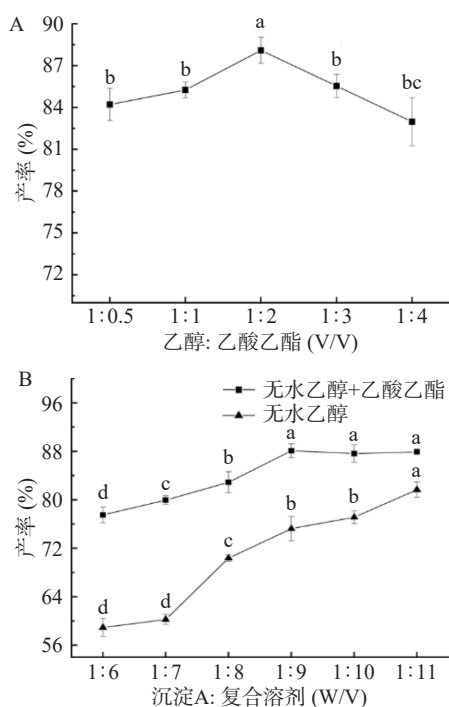


图 6 蛋黄油产率的优化

Fig.6 The optimization of egg yolk oil yield

注: A: 乙醇与乙酸乙酯的比例对蛋黄油产率的影响; B: 沉淀 A 与复合溶剂的不同配比对蛋黄油产率的影响。

2.4 PL 的提取条件选择

在提取蛋黄油的基础上,进一步采用乙酸乙酯从蛋黄总脂中沉淀出 PL。乙酸乙酯是一种非极性溶剂,具有价格低廉、低毒性、易挥发等特点。结果表明,温度对 PL 提取率的影响较大,如图 7A 所示,在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下蛋黄总脂中 PL 的含量(the content of PL in lipids, CPLL)为 31.43%,可能是因为低温会降低 PL 的溶解度。而在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 PL 的纯度为 56.4%,远低于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下的纯度,可能是中性脂质在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下共沉淀的结果。综合考虑 CPLL 和纯度,选择 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下沉淀 PL。

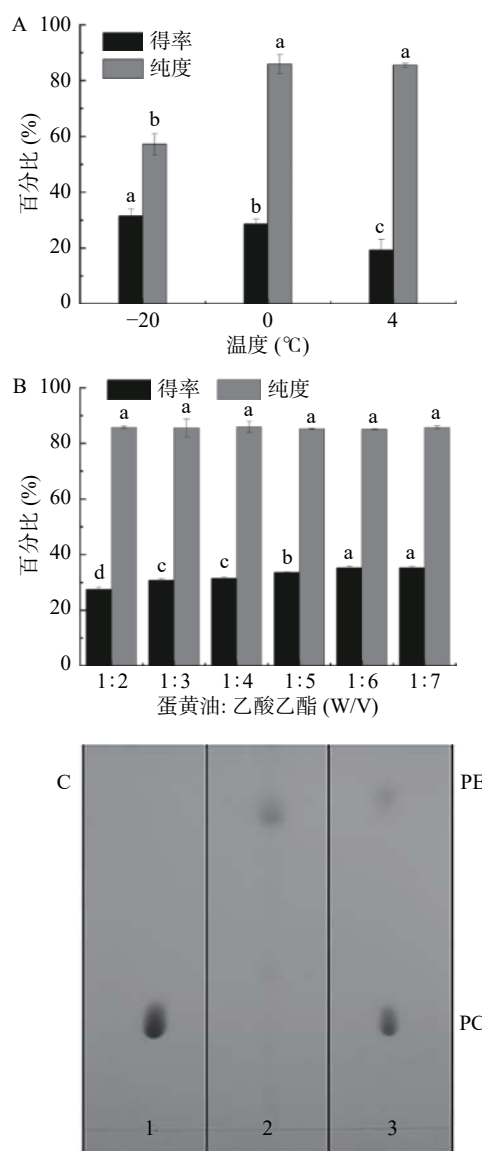


图 7 PL 提取效率的优化

Fig.7 The optimization of PL extraction efficiency

注: A: 温度对蛋黄总脂中 PL 纯度和得率的影响; B: 乙酸乙酯的量对蛋黄总脂中 PL 纯度和得率的影响; C: PL 的薄层色谱图; 1: PC 标准样品; 2: PE 标准样品; 3: PL 样品。

图 7B 为乙酸乙酯对 CPLL 和 PL 得率的影响。所得 PL 的纯度(约 85.94%)与乙酸乙酯浓度没有显著差异。随着蛋黄油中乙酸乙酯(w/v)比例的增加, CPLL 显著增加($P<0.05$)。在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, 蛋黄油/乙酸乙酯为 1:6(w/v)条件下, PL 样品的纯度为 85.94%, CPLL 为 35.18%。WANG 等^[9]用 95% 乙醇提取 PL, 最终纯度为 80%, 表明乙酸乙酯提取可获得纯度较高的 PL。结果表明, 用乙酸乙酯提取 PL 具有较好的效果。PL 样品的薄层色谱分析如图 7C 所示, 表明所获得的 PL 主要由 PC 和 PE 组成, 且 PC 占了样本的大部分。

2.5 脂肪酸组成分析

进一步对蛋黄总脂和 PL 中脂肪酸组成进行气相色谱分析, 结果如表 2 所示。由表 2 可知, 两种样品中都存在 8 种脂肪酸。蛋黄总脂的脂肪酸组成具

有最高的油酸含量(C18:1),其次是相同比例的饱和棕榈油酸(C16:0)。脂肪酸含量由高到低依次为:单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acid, MUFA)>饱和脂肪酸(saturated fatty acid, SFA)>多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)。PC的脂肪酸含量由高到低依次为:SFA>MUFA>PUFA,饱和脂肪酸含量由12.67%上升到24.41%,而总单不饱和脂肪酸含量明显下降,可能是由于油酸(C18:1)含量的下降。PUFA/SFA比值和n-6/n-3比值都是人体营养膳食的重要诱导因子。已有研究表明,建议膳食中PUFA/SFA的比值大于0.4, n-6/n-3的比值不大于4^[42-43]。表2中的数据表明PL具有合适的PUFA/SFA比值(0.70),蛋黄总脂和PL的n-6/n-3比值分别为12.6和5.37。本方法提取的PL样品含有丰富且平衡的脂肪酸成分,是为人类营养提供平衡膳食的良好添加剂。

表2 蛋黄总脂和PL的脂肪酸组成

Table 2 Fatty acid compositions of total egg yolk lipids and phospholipids

脂肪酸	含量(%)	
	蛋黄总脂	PL
C16:0	25.21±0.17	25.86±0.26
C16:1	4.73±0.11	2.46±0.06
C18:0	7.64±0.31	8.82±0.13
C18:1	41.60±0.33	26.80±0.34
C18:2n-6	10.64±0.10	15.51±0.21
C20:4n-6	1.09±0.02	5.07±0.08
C22:5n-3	0.44±0.03	2.31±0.06
C22:6n-3	0.50±0.06	1.52±0.02
SFA	32.85±0.48	34.68±0.41
MUFA	46.33±0.44	29.26±0.40
PUFA	12.67±0.33	24.41±0.37
n-3	0.94±0.09	3.83±0.08
n-6	11.73±0.12	20.58±0.29
PUFA/SFA	0.39±0.02	0.70±0.02
n-6/n-3	12.60±1.33	5.37±0.18

3 结论

在不使用有毒溶剂的前提下,从新鲜的鸡蛋黄中依次分离出IgY、PV和PL。采用了盐析和PEG结合的新方法从WSF中纯化IgY,以此获得高得率、高纯度的IgY样品;用乙酸乙酯和乙醇作为复合溶剂,同时提取了PV和蛋黄油。在最佳条件下,PV和蛋黄油可以得到更大程度的分离;用冷冻非极性溶剂乙酸乙酯处理蛋黄总脂,得到了大量高纯度的PL,且PL具有良好的PUFA/SFA比值,可作为食品工业添加剂。结果表明,本研究通过绿色高效连续分离技术能够获得纯度、得率较高的IgY、PV和PL组分,该方法便捷、高效,在工业化生产中具有很大的应用潜力。

参考文献

- [1] WANG L H, LI X Y, JIN L J, et al. Characterization of chicken egg yolk immunoglobulins(IgYs) specific for the most prevalent capsular serotypes of mastitis-causing *Staphylococcus aureus*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 84(3-4): 264-271.
- [2] OLIVER C, VALENZUELA K, SILVA H, et al. Effectiveness of egg yolk immunoglobulin against the intracellular salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 119(2): 365-376.
- [3] PEREIRA E P V, TILBURG M F V, FLOREAN E O P T, et al. Egg yolk antibodies(IgY) and their applications in human and veterinary health: A review[J]. *International Immunopharmacology*, 2019, 73(3): 293-303.
- [4] CUI Y, LI X, LU M, et al. Role of polysaccharide conjugation in physicochemical and emulsifying properties of egg phosphatidylcholine and the calcium binding capacity of its phosphopeptides[J]. *Food & Function*, 2019, 10(4): 1808-1815.
- [5] DUAN X, ZHOU Y, LI M, et al. Postfertilization changes in conformation of egg yolk phosphatidylcholine and biological activities of phosphopeptides[J]. *Food Research International*, 2014, 62: 1008-1014.
- [6] DUFFULER P, GIARRATANO M, NADERI N, et al. High hydrostatic pressure induced extraction and selective transfer of β -phosphatidylcholine from the egg yolk granule to plasma fractions[J]. *Food Chemistry*, 2020, 321(12): 66-74.
- [7] GUO D, WAN P, LIU J, et al. Use of egg yolk phospholipids to boost the generation of the key odorants as well as maintain a lower level of acrylamide for vacuum fried French fries[J]. *Food Control*, 2020, 121: 107592.
- [8] HOOGEVEST P V, TIEMESSEN H, METSELAAR J M, et al. The use of phospholipids to make pharmaceutical form line extensions[J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2021, 123(4): 1-38.
- [9] WANG H, YAO L, LEE S L, et al. Simultaneous texturization and extraction of phospholipids from liquid egg yolk using renewable solvents[J]. *European Journal of Lipid Science & Technology*, 2017, 119(2).
- [10] TONG C, GENG F, HE Z, et al. A simple method for isolating chicken egg yolk immunoglobulin using effective delipidation solution and ammonium sulfate[J]. *Poultry science*, 2015, 94(1): 104-110.
- [11] KONDRATOWICZ A, NEUNERT G, NIEZGODA N, et al. Egg yolk extracts as potential liposomes shell material: Composition compared with vesicles characteristics[J]. *Journal of Food Science*, 2018, 83(10-12): 2527-2535.
- [12] BERNARDO J, VIDEIRA R A, VALENTAO P, et al. Extraction of phospholipid-rich fractions from egg yolk and development of liposomes entrapping a dietary polyphenol with neuroactive potential[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 133: 110749-110749.
- [13] 张元来, 张兆旺. 水稀释法与辛酸法提取鸡卵黄抗体的比较[J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 36(1): 28-33. [ZHANG Y L, ZHANG Z W. Comparison of water dilution method and caprylic acid method of extracting yolk antibodies[J]. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2017, 36(1): 28-33.]
- [14] ZHOU X, WANG Y R, AHN D U, et al. An easy and simple separation method for Fc and Fab fragments from chicken immunoglobulin Y(IgY)[J]. *Journal of Chromatography B*, 2020: 1141.
- [15] TAN S H, MOHAMEDALI A, KAPUR A, et al. A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure

- ture[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2012, 380(1-2): 73-76.
- [16] REDWAN E M, ALJADAWI A A, UVERSKY V N. Simple and efficient protocol for immunoglobulin Y purification from Chicken egg yolk[J]. *Poultry Science*, 2021, 100(3).
- [17] AKITA E M, NAKAI S. Immunoglobulins from egg-yolk isolation and purification[J]. *Journal of Food Science*, 1992, 57: 629-634.
- [18] REN H, YANG W J, THIRUMALAI D, et al. A comparative evaluation of six principal IgY antibody extraction methods[J]. *Alternatives to Laboratory Animals*, 2016, 44: 11-20.
- [19] KO K Y, AHN D U. Preparation of immunoglobulin Y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography[J]. *Poultry Science*, 2007, 86(2): 400-407.
- [20] JIANG X, DIRAVIVAM T, ZHANG X. Affinity purification of egg yolk immunoglobulins(IgY) using a human mycoplasma protein[J]. *Journal of Chromatography B*, 2016, 1012-1013: 37-41.
- [21] BALARAMAN H B, RATHNASAMY S K. High selective purification of IgY from quail egg: Process design and quantification of deep eutectic solvent based ultrasound assisted liquid phase microextraction coupled with preparative chromatography-Science-Direct[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 146: 253-262.
- [22] GE S, YANG Y, CHELLIAPPAN B, et al. Evaluation of different IgY preparation methods and storage stability as potential animal feed supplement[J]. *Pakistan Journal of Zoology*, 2020, 52(6): 2305-2311.
- [23] LEE H Y, ABEVRATHNE E D N S, CHOI I, et al. Sequential separation of immunoglobulin Y and phosvitin from chicken egg yolk without using organic solvents[J]. *Poultry science*, 2014, 93: 2668-2677.
- [24] XU C N, YIN Y G, WANG E L, et al. Optimized process of extracting phosvitin from hen egg yolk based on genetic algorithm[J]. *Journal of Jilin University(Engineering and Technology Edition)*, 2011, 41(3): 876-881.
- [25] LOSSO J, NAKAI S. A simple procedure for the isolation of phosvitin from chicken egg yolk[J]. *Egg Uses and Processing Technologies*, 1994, 21(2): 150-157.
- [26] CASTELLANIO, MARTINET V, DAVID-BRIAND E, et al. Egg yolk phosvitin: Preparation of metal-free purified protein by fast protein liquid chromatography using aqueous solvents[J]. *Journal of Chromatography B*, 2003, 791(1-2): 273-284.
- [27] SAMOOEL J, UK A D, KI CHANG N, et al. Separation of phosvitin from egg yolk without using organic solvents[J]. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 2013, 26(11): 1622-1629.
- [28] ZHANG X, QIU N, GENG F, et al. Simply and effectively preparing high-purity phosvitin using polyethylene glycol and anion-exchange chromatography[J]. *Journal of Separation Science*, 2011, 34(22): 3295-3301.
- [29] KO K Y, NAM K C, JO C, et al. A simple and efficient method for preparing partially purified phosvitin from egg yolk using ethanol and salts[J]. *Poultry Science*, 2011, 90(5): 1096-1104.
- [30] SPRICK B, LINGHU Z, AMA MCH ARLA J K, et al. Selective extraction of phospholipids from whey protein phospholipid concentrate using supercritical carbon dioxide and ethanol as a co-solvent[J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(12): 10855-10866.
- [31] LI B, LINGHU Z, HUSSAIN F, et al. 0536 Extraction of phospholipids from procream using supercritical carbon dioxide and ethanol as a modifier[J]. *Journal of Animal Science*, 2016, 94(5): 256.
- [32] LI Y, OBADI M, QI Y, et al. Extraction of oat lipids and phospholipids using subcritical propane and dimethyl ether: Experimental data and modeling[J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2020, 123(1).
- [33] BOSELLI E, CABONI M F. Supercritical carbon dioxide extraction of phospholipids from dried egg yolk without organic modifier[J]. *Journal of Supercritical Fluids*, 2000, 19(1): 45-50.
- [34] 周欣. 鸡卵黄免疫球蛋白 Fab 片段的制备及其抗炎活性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020. [ZHOU X. Preparation of Fab fragment of immunoglobulin of egg yolk and its anti-inflammatory activity[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020.]
- [35] MINE Y. Egg bioscience and biotechnology[J]. *Egg Bioscience and Biotechnology-Research and Markets*, 2008, 3(5): 48-55.
- [36] 刘颖, 肖静静, 李硕绵, 等. 蛋黄卵磷脂提取方法的研究[J]. 河北农业大学学报, 2013, 36(6): 105-108. [LIU Y, XIAO J J, LI S J, et al. Study on the extraction methods of egg yolk lecithin[J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2013, 36(6): 105-108.]
- [37] REN J, WU J. Thermal-aided phosvitin extraction from egg yolk[J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 2015, 95: 2595-2600.
- [38] JIANG B, WANG L, WANG X, et al. Ultrasonic thermal-assisted extraction of phosvitin from egg yolk and evaluation of its properties[J]. *Polymers*, 2019, 11(8).
- [39] NASOPOULOU C, GOGAKI V, PANAGOPOULOU E, et al. Hen egg yolk lipid fractions with antiatherogenic properties[J]. *Animal Science Journal*, 2013, 84(3): 264-271.
- [40] NIELSEN H, SHUKLA V K S. In situ solid phase extraction of lipids from spray-dried egg yolk by ethanol with subsequent removal of triacylglycerols by cold temperature crystallization[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2004, 37(6): 613-618.
- [41] KOVALCUKS A, DUMA M. Solvent extraction of egg oil from liquid egg yolk[C]. *Baltic Conference on Food Science & Technology* 2014.
- [42] BELHAJ K, MANSOURI F, SINDIC M, et al. Effect of rearing season on meat and intramuscular fat quality of beni-guil sheep[J]. *Journal of Food Quality*, 2021, 101(7): 1-9.
- [43] HOWES N L, BEKHIT E, BURRITT D J, et al. Opportunities and implications of pasture-based lamb fattening to enhance the long-chain fatty acid composition in meat[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety*, 2015, 14(1): 22-36.