

祝海娟,赵晨霞,张翌楠,等. 盐法提取大麦虫蛋白质的研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):274-276.

盐法提取大麦虫蛋白质的研究

祝海娟¹, 赵晨霞², 张翌楠², 刘沐阳², 彭旭嗣², 霍卫东²

(1. 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆乌鲁木齐 8430012; 2. 北京农业职业学院园艺系, 北京 102442)

摘要:采用盐提法提取大麦虫蛹中的蛋白质。以蛋白质提取率为评价指标,通过单因素试验研究了盐浓度、料液比、提取温度、提取时间对大麦虫蛹中蛋白质提取率的影响。在单因素试验基础上,通过正交试验优化提取工艺。结果表明:大麦虫蛹中蛋白质的最佳提取工艺条件为盐浓度 1.0 g/100 mL、料液比 1 g : 15 mL、提取温度 50 ℃、提取时间 2.0 h。在此条件下,通过 3 次验证试验所得蛋白质产品的粗蛋白质含量为 76.22%,蛋白质提取率为 53.74%。

关键词:大麦虫;蛹;蛋白质;提取率;优化

中图分类号: Q969.97 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0274-03

统计资料表明,全世界有 2/3 的人缺乏蛋白质,在人口急剧增长的趋势下,寻求新的蛋白质资源已成为摆在我们面前的一项迫切的任务。随着社会的发展,人们清楚地认识到,昆虫蛋白是一类极具开发潜力的蛋白质资源。一方面,它来源广泛、产量大、易于加工;另一方面,昆虫蛋白营养成分十分全面、均衡,是真正的纯天然蛋白^[1]。因此,21 世纪昆虫蛋白是世界开发的重点,将成为微生物细胞之后的又一大类蛋白食品来源^[2]。

大麦虫隶属于节肢动物门、昆虫纲、鞘翅目、拟步甲科、粉甲属^[3-6]。大麦虫幼虫含蛋白质 51%,脂肪 29%,并含有多种糖类、氨基酸、维生素、激素、酶及矿物质磷、铁、钾、钠、钙等。长期以来,由于对大麦虫缺乏系统的研究,大麦虫基本作为低廉的动物饲料,未能得到充分和有效的利用。而蛋白类功能性食品的开发无疑是大麦虫深加工最值得探索的路径之一。但是要开发蛋白类功能性食品,首先要解决的就是蛋白质提取工艺问题。本研究以大麦虫蛹为原料,采用超临界 CO₂ 萃取装置脱除大麦虫蛹中脂肪后,采用盐提法提取大麦

虫蛋白质,通过单因素试验和正交试验确定蛋白质的最佳提取工艺条件,试图初步探索出一条大麦虫蛋白质提取的合理路径,为今后大麦虫的综合利用提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 大麦虫蛹,由北京农业职业学院生物防治研究所资源昆虫研究室提供,在常规条件下饲养并适时取样。

D36 mm 进口透析袋(MW:8000-14000,5 m),购买于北京德诺奥生物科技有限公司。

1.1.2 试剂 氯化钠、氢氧化钠、浓盐酸、36%浓硫酸、五水合硫酸铜、硫酸钾、甲基红、溴甲酚绿、95%乙醇,均为市售分析纯。

1.2 仪器与设备

HA221-50-06 型超临界萃取装置(南通华安超临界萃取有限公司),FW135 型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),DZF-6000 系列电热真空干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),BS-124S 分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司),NSKY-200B 恒温培养振荡器(上海苏坤实业有限公司),HR/T20MM 台式大容量高速冷冻离心机(湖南赫西仪器装备有限公司),JB-5 定时双向数显恒温磁力搅拌器(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司),K-06 型全自动定氮仪(上海晟声自动化分析仪器有限公司),PP-50 Sartorius pH 计(北京赛多利斯科学仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 大麦虫脱脂蛹粉制备 将大麦虫蛹进行冷冻处理以

收稿日期:2013-03-01

基金项目:北京市教育委员会科技发展计划(编号:KM200900005002);北京市农业科技项目(编号:20110115);北京市自然科学基金(编号:6122024);国家公益性行业科研专项(编号:200904025)。

作者简介:祝海娟(1987—),女,江苏如皋人,硕士研究生,研究方向为昆虫蛋白。E-mail:119333909@qq.com。

通信作者:赵晨霞,硕士,教授,研究方向为昆虫蛋白。E-mail:chenxiazhao@sina.com。

[2] Abe Y, Umemura S, Sugimoto K, et al. Effect of green tea rich in γ -aminobutyric acid on blood pressure of Dahl salt-sensitive rats [J]. American Journal of Hypertension, 1995, 8(1): 74-79.

[3] 王来仪. γ -氨基丁酸,受体药理学及对心血管活动的调节[J]. 心血管学报, 1991, 10(1): 46-49.

[4] 黄友谊, 杨 坚. 中国特种茶加工[M]. 北京:中国农业出版社, 2004: 271-272.

[5] Shelp B J, Bown A W, McLean M D. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid [J]. Trends Plant Sci, 1999, 4(11):

446-452.

[6] 黄亚辉. 茶树种质间谷氨酸脱羧酶活性差异[D]. 长沙:中南林业科技大学, 2010: 38-40.

[7] 竹内敦子, 泽井裕典, 深津修一. 茶叶中酸量嫌气处理的温度时间与影响[J]. 茶研报, 1994, 80: 13-16.

[8] 张 定, 汤琴琴, 陈 暄, 等. 叶面喷施氨基酸对茶叶中 γ -氨基丁酸含量的影响[J]. 茶叶科学, 2006, 26(4): 237-242.

[9] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社, 2003: 132-166.

杀死大麦虫,待虫体冷冻完全后取出,置于60℃真空干燥箱中干燥至恒重。烘干的大麦虫粉碎后过40目筛,用超临界萃取装置脱脂,将脱脂蛹粉装入密封盒中,置于4℃冰箱保存备用。

1.3.2 大麦虫蛋白质的提取及含量测定 采用盐提法来研究大麦虫蛹中蛋白质的提取工艺,以蛋白质提取率为评价指标进行试验^[7-8]。

主要工艺流程:2 g 脱脂蛹粉 → 一定温度、时间、料液比、浓度的盐溶液浸提 → 10 000 r/min 离心 15 min (去虫渣) → 用 1 mol/L HCl、1 mol/L NaOH 调 pH 值至等电点 → 10 000 r/min 离心 15 min (去上清液) → 含盐蛋白 → 透析除盐 → 60℃ 烘干至恒重 → 产品蛋白。

蛋白质含量测定:凯氏定氮法^[9],参考GB 5009.5—2010。

1.3.3 蛋白质提取率的计算^[10]

蛋白质提取率 = $\frac{\text{大麦虫产品重量} \times \text{产品蛋白质含量}}{\text{大麦虫脱脂蛹粉重量} \times \text{脱脂蛹粉蛋白质含量}} \times 100\%$

1.3.4 单因素试验设计 盐浓度对蛋白质提取率的影响:NaCl 浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g/100 mL,料液比(g/mL)1:10,提取温度40℃,搅拌提取时间2 h,沉淀温度6℃,沉淀时间2 h。

料液比对蛋白质提取率的影响:料液比(g:mL)分别为1:5、1:10、1:15、1:20、1:25,盐浓度1.0 g/100 mL,提取温度40℃,搅拌提取时间2 h,沉淀温度6℃,沉淀时间2 h。

提取温度对蛋白质提取率的影响:提取温度分别为20、30、40、50、60℃,盐浓度1.0 g/100 mL,料液比1 g:10 mL,搅拌提取时间2 h,沉淀温度6℃,沉淀时间2 h。

提取时间对蛋白质提取率的影响:提取时间分别为1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h,盐浓度1.0 g/100 mL,料液比1 g:10 mL,提取温度40℃,沉淀温度6℃,沉淀时间2 h。

1.3.5 正交优化试验设计 根据单因素试验结果,选择盐浓度、料液比、提取温度、提取时间进行4因素3水平 $L_9(3^4)$ 正交试验(表1)。

表1 大麦虫蛋白质提取正交试验因素水平

水平	A:盐浓度 (g/100 mL)	B:料液比 (g:mL)	C:提取温度 (℃)	D:提取时间 (h)
1	0.5	1:10	30	1.5
2	1.0	1:15	40	2.0
3	1.5	1:20	50	2.5

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 盐浓度对蛋白质提取率的影响 由图1可知,随着盐浓度的升高,蛋白质的提取效果增强,碱液浓度达到1.0 g/100 mL时,蛋白质提取率达到最大,随着盐浓度的继续增大,蛋白质提取率逐渐降低。蛋白质可溶于盐溶液中,称为盐溶作用,离子强度较低的中性盐溶液有促进蛋白质溶解、保护蛋白质活性的作用,离子强度高则会引起蛋白质发生盐析作用^[11]。因此,蛋白质溶解度受到盐溶液浓度的影响。开始时,盐浓度过低,蛋白质还没有完全溶解;随着盐浓度的提高,盐会增加蛋白质分子表面的电荷,增强蛋白质分子与水分子

的作用,从而使蛋白质在水溶液中的溶解度增大^[12],蛋白质越易被提取;但离子强度过大,会破坏蛋白质分子表面层,使蛋白质发生沉降,蛋白质可能被盐析而不溶解于盐溶液中,从而使蛋白质提取率降低。

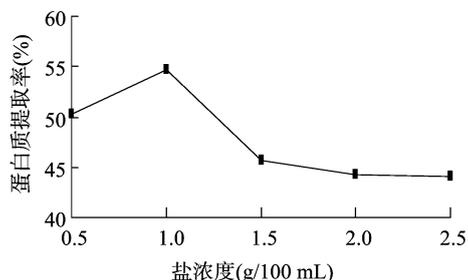


图1 盐浓度与蛋白质提取率的关系

2.1.2 料液比对蛋白质提取率的影响 由图2可知,当料液比从1 g:5 mL增加至1 g:15 mL区间时,蛋白质提取率不断升高,料液比达到1 g:15 mL时,蛋白质提取率达到最大。当料液比继续升高时,蛋白质提取率逐渐下降。在蛋白质的提取过程中,若料液比太小,蛋白质不能被完全溶解出来,提取率偏低;若料液比过大,蛋白质虽能充分溶解,但水溶型蛋白质的损失增加,因而回收率低^[13],蛋白质提取率下降,并会造成原料浪费,增加食品工业的成本。

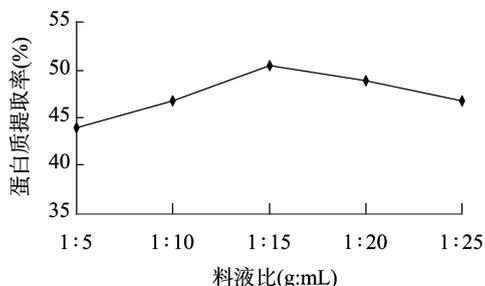


图2 料液比与蛋白质提取率的关系

2.1.3 提取温度对蛋白质提取率的影响 由图3可知,随着提取温度的升高,蛋白质提取率稍有增加。当提取温度达到40℃时,蛋白质提取率为最高。因为温度升高,分子运动速度加快,蛋白质较容易从原料中溶解出来;但温度高于40℃以后,蛋白质提取率逐渐下降,这可能是由于高温使部分蛋白质发生变性的缘故,而且各种微生物也容易孳生繁殖,直接影响产品质量。

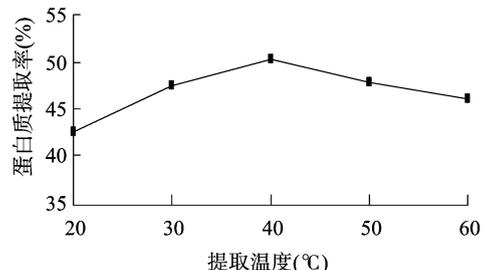


图3 提取温度与蛋白质提取率的关系

2.1.4 提取时间对蛋白质提取率的影响 由图4可知,随着提取时间的延长,蛋白质提取率先增加后减小。当提取时间

达到2 h时,蛋白质提取率为最高。因为提取时间过短,蛋白质还没有完全从原料中溶解出来。随着提取时间的延长,提取溶剂逐渐挥发,料液比会随之减小,使蛋白质提取降低,并会造成蛋白质变质。此外,这种现象的发生也可能是由于随着提取时间的延长,溶液中的蛋白质出现凝聚沉淀,过滤时蛋白质沉淀与残渣一同被排除,从而降低了蛋白质提取率^[14]。

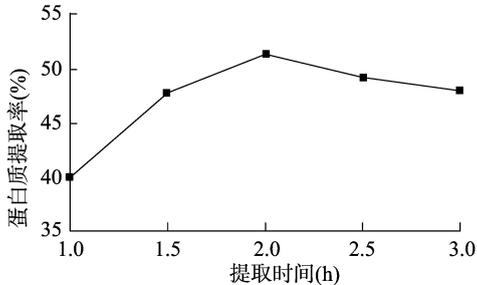


图4 提取时间与蛋白质提取率的关系

2.2 正交优化试验

以盐浓度、料液比、提取温度、提取时间为4因素,按 $L_9(3^4)$ 进行正交试验,以蛋白提取率为评价标准,优化出大麦虫脱脂蛹粉中蛋白质的最佳提取工艺,得出正交试验结果。

2.2.1 正交试验的极差分析 对试验结果进行极差分析,结果如表2所示。

表2 大麦虫蛋白质提取正交试验的极差分析

试验号	A:盐浓度	B:料液比	C:提取温度	D:提取时间	提取率(%)
1	1	1	1	1	46.46
2	1	2	2	2	50.88
3	1	3	3	3	49.24
4	2	1	2	3	48.95
5	2	2	3	1	52.32
6	2	3	1	2	49.69
7	3	1	3	2	45.65
8	3	2	1	3	47.55
9	3	3	2	1	46.73
k_1	48.860	47.020	47.900	48.503	
k_2	50.320	50.250	48.853	48.740	
k_3	46.643	48.553	49.070	48.580	
R	3.677	3.230	1.170	0.237	

正交试验的极差分析结果表明,4个因素中影响大麦虫蛋白质提取率的最主要因素是盐浓度,其次是料液比、提取温度,最后为提取时间。综合各因素作用,得到盐提法的最佳工艺条件为: $A_2B_3C_3D_2$,即盐浓度为1.0 g/100 mL、料液比1 g:15 mL、提取温度50℃、提取时间2.0 h。在此条件下,进行3次重复的验证试验,所得蛋白质产品的粗蛋白含量为76.22%,蛋白质提取率为53.74%。

2.2.2 正交试验的方差分析 对“2.2.1”的极差数据进行方差分析,结果如表3所示。

表3方差分析结果表明:在大麦虫蛋白质提取试验过程中,盐浓度、料液比、提取温度和提取时间均为不显著因素。

3 结论

通过单因素试验及正交试验的结果并综合考虑各因素在

表3 大麦虫蛋白质提取正交试验的方差分析

误差来源	偏差平方和	自由度	F比
A	20.563	2	2.129
B	15.663	2	1.622
C	2.325	2	0.241
D	0.087	2	0.009
误差	38.64	8	

注: $F_{0.05} = 4.460, F_{0.01} = 8.650$ 。

实际中的可操作性,得到大麦虫蛋白质的最佳提取条件为:盐浓度为1.0 g/100 mL、料液比1 g:15 mL、提取温度50℃、提取时间2.0 h。在此条件下,所得蛋白质产品的粗蛋白含量为76.22%,蛋白质提取率为53.74%。

本试验是以NaCl溶液为提取剂提取大麦虫脱脂蛹粉中的蛋白质,结果表明,此方法是合理可行的,有助于大麦虫蛋白资源的研究与开发。

所得产品蛋白纯度偏低的原因可能是含有核酸、多糖等杂质,如何除杂以提高大麦虫蛋白的纯度是今后需要进一步研究的工作。此外,影响大麦虫蛋白质提取的因素还有沉淀温度、沉淀时间、原料的破碎程度、原料中残余脂肪的含量等,这些因素对大麦虫蛋白质提取率的具体影响还有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 杨金兰, 阎杰. 昆虫蛋白开发利用的研究进展[J]. 广东农业科学, 2011, 38(2): 114-116.
- [2] 刘建明, 徐志华. 昆虫蛋白质的开发与应用[J]. 安徽农学通报, 2006, 12(7): 132, 172.
- [3] 采克俊, 张丽倩, 刘莉. 大麦虫养殖技术[J]. 现代农业科学, 2008, 15(5): 38-39.
- [4] 欧晓峰, 张建新, 郭倩, 等. 复合酶法水解大麦虫蛋白制备酸性多肽及其抗氧化活性[J]. 西北农业学报, 2010, 19(2): 189-193.
- [5] 张建新, 郭倩, 何桂梅, 等. 大麦虫水溶蛋白的分离纯化及抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(18): 30-33.
- [6] 刘娜, 张建新, 何桂梅, 等. 响应面法优化大麦虫SOD提取条件的研究[J]. 西北农业学报, 2011, 20(3): 120-124.
- [7] 仲义, 史树森, 梁焯赫, 等. 不同方法提取昆虫蛋白质效果比较[J]. 吉林农业科学, 2009, 34(3): 58-60, 64.
- [8] 杨海涛, 刘军海. 蚕豆蛋白质提取工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(2): 76-78.
- [9] GB 5009.5—2010. 食品安全国家标准食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [10] 裴小平, 唐道邦, 肖更生, 等. 鸡肉蛋白提取工艺研究[J]. 食品科技, 2009, 34(8): 198-201.
- [11] 潘怡欧. 昆虫蛋白质提取工艺的比较研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2005: 1-58.
- [12] 蓝瑞阳, 朱威, 季文静, 等. 蜂王浆蛋白质提取工艺研究[J]. 蜜蜂杂志, 2008, 28(3): 18-20.
- [13] 冀宪刚, 盖英萍. 黄粉虫蛋白质的提取工艺研究[J]. 食品科技, 2000(5): 24-25.
- [14] 李凤英, 崔蕊静, 李春华. 葡萄籽蛋白质的提取工艺研究[J]. 中国油脂, 2005, 30(4): 50-53.