

祝海娟,赵晨霞,张翌楠,等. 酶法提取大麦虫蛋白质的研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):226-229.

# 酶法提取大麦虫蛋白质的研究

祝海娟<sup>1</sup>, 赵晨霞<sup>2</sup>, 张翌楠<sup>2</sup>, 刘沐阳<sup>2</sup>, 彭旭嗣<sup>2</sup>, 霍卫东<sup>2</sup>

(1. 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆乌鲁木齐 843001; 2. 北京农业职业学院园艺系, 北京 102442)

**摘要:**为研究大麦虫蛋白质提取的最佳生产工艺,采用酶法从大麦虫蛹中提取大麦虫蛋白。根据碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶 5 种酶制剂对大麦虫蛋白提取率的影响,确定碱性蛋白酶为最佳酶制剂。通过单因素试验和正交试验,得到碱性蛋白酶提取大麦虫蛋白的最佳条件为加酶量(E/S)5%、pH 值 12、料液比 1 g:20 mL、提取温度 50 ℃、提取时间 2.5 h,在此条件下得到大麦虫蛋白的提取率为 86.96%,大麦虫蛋白含量 75.01%。该工艺合理,重复性好,可为大麦虫蛋白质提取工艺的确定提供试验依据。

**关键词:**酶法;大麦虫;蛹;蛋白质;提取率

**中图分类号:**TS201.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)09-0226-04

我国昆虫资源十分丰富,资源昆虫大麦虫别称麦片虫、麦谷虫或超级面包虫,它不仅是生理、遗传学的试验材料,而且是营养丰富的高蛋白质资源。据 Finke 报道,与家蝇、黄粉虫幼虫、蟋蟀、蚕蛹幼虫等比较,大麦虫的蛋白质及蛋氨酸的含量均居首位,是一种不可多得的蛋白源昆虫<sup>[1]</sup>。大麦虫的各虫态都含有较丰富的营养,其中大麦虫幼虫含蛋白质 51%,含脂肪 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。目前,越来越多的人选购大麦虫作为名贵观赏鱼、捕食性动物和两栖爬行类宠物的专用饵料<sup>[2]</sup>,而在食品、医药保健品及生物活性肽方面的开发利用还处于初始阶段。

蛋白质由于其特定的功能性质广泛用于食品领域<sup>[3]</sup>。近年来科学研究发现,人类摄取蛋白质后的消化产物更容易被人体吸收利用,而且具有各类生物活性,这些就是肽<sup>[4]</sup>。酶法提取蛋白质是利用蛋白酶对蛋白质的降解和修饰,使其

变成可溶肽而被抽提出来<sup>[5]</sup>。用酶提取蛋白质,反应条件温和<sup>[6-8]</sup>,副反应少,不破坏氨基酸,保证了蛋白质的质量,且不污染环境,对蛋白质有改性作用,蛋白质经酶水解有助于拓宽蛋白质的应用范围<sup>[9-10]</sup>。

大麦虫为节肢昆虫,甲壳质含量较高<sup>[11]</sup>,为了促进机体对其蛋白质的吸收及利用,并使消费者在心理上易于接受大麦虫制品,本试验采用酶法从大麦虫蛹中提取蛋白质,确定蛋白酶提取大麦虫蛋白的最佳工艺参数,以期为大麦虫蛋白质的开发利用提供科学依据。

## 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。

1.1.2 试剂 中性蛋白酶:活力 $\geq 60\ 000\ \text{U/g}$ ,生化试剂级,北京德诺奥生物技术有限责任公司分装;碱性蛋白酶:活力 $\geq 100\ 000\ \text{U/g}$ ,生化试剂级,北京德诺奥生物技术有限责任公司分装;木瓜蛋白酶:活力 $\geq 0.5\sim 2\ \text{U/mg}$ ,生化试剂级,美国 AMRESCO 公司生产;胰蛋白酶:活力 $\geq 250\ \text{NF/mg}$ ,生化试剂级,美国 AMRESCO 公司生产;胃蛋白酶:活力 $\geq 1\ 200\ \text{U/g}$ ,生化试剂级,北京德诺奥生物技术有限责任公司分装;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%乙醇等试剂均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

药材,1991,14(7):15-17.

[6]杨永红,杨林福,范建,等. 青叶胆可持续利用策略研究[J]. 中国民族民间医药杂志,2003(2):107-109.

[7]钟方丽,王慧竹,祝波. 青叶胆中总黄酮的提取工艺研究[J]. 吉林化工学院学报,2010,27(3):11-13.

[8]刘玉芬,夏海涛,杨树平. 紫外分光光度法测定剑麻花中总黄酮的含量[J]. 食品科学,2005,26(9):418-419.

[9]张益娜,翁琴. 沙棘叶总黄酮的抑菌性研究[J]. 农产品加工·学刊,2008(9):25-27.

[10]郑津辉,王威,黄辉. 苦参提取液中黄酮类化合物的抑菌作用[J]. 武汉大学学报:理学版,2008,54(4):439-442.

收稿日期:2013-02-15

基金项目:国家公益性行业科研专项(编号:200904025);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)。

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,研究方向为果蔬贮藏与加工。E-mail:chenxi Zhao@sina.com。

## 参考文献:

[1]云南省药物研究所. 云南天然药物图鉴(第二卷)[M]. 昆明:云南科技出版社,2007.

[2]郭爱华,李军,付宏征,等. 青叶胆酮类化合物的成分研究[J]. 中草药,2003,34(2):107-109.

[3]李旭山,江志勇,王福生,等. 青叶胆化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(23):2790-2793.

[4]高丽. 青叶胆及民间习用品的鉴定[J]. 云南中医中药杂志,2006,27(4):65-66.

[5]宋万志. 龙胆科的资源植物——“青叶胆”和“藏茵陈”[J]. 中

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);TEM1880 型高低温交变湿热试验箱(北京凯维丰科技发展有限公司)。

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 采用酶解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<sup>[12-13]</sup>。

主要工艺流程:2 g 大麦虫脱脂蛹粉→加蒸馏水→搅拌后调至适当的温度、pH 值→加酶→置于恒温培养振荡器(100 r/min),反应一定时间→灭酶(80℃、10 min)→冷却→离心(10 000 r/min、15 min)→收集上清液(蛋白浓缩物)→60℃ 烘干至恒重→产品蛋白。

蛋白质含量测定:凯氏定氮法<sup>[14]</sup>,参考 GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定》。

1.3.3 蛋白质提取率的计算<sup>[15]</sup>

蛋白质提取率 =  $\frac{\text{大麦虫产品质量} \times \text{产品蛋白质百分含量}}{\text{大麦虫脱脂蛹粉质量} \times \text{脱脂蛹粉蛋白质百分含量}} \times 100\%$

1.3.4 酶制剂的筛选<sup>[16]</sup> 酶法提水解蛋白质的酶制剂种类很多,为使酶法提取大麦虫蛋白达到理想的程度,根据所查文献资料,分别选取中性蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶等 5 种酶,在厂家推荐的最佳酶解条件下来提取大麦虫蛋白质,然后测定蛋白质提取率,选择最佳酶。不同种类酶的具体提取条件如表 1 所示。

表 1 不同种类酶提取大麦虫蛋白质的条件

酶种类	提取条件				
	提取温度(℃)	pH 值	添加量(%)	料液比(g:mL)	提取时间(h)
碱性蛋白酶	50	10.0	2	1:10	2
中性蛋白酶	40	7.0	2	1:10	2
木瓜蛋白酶	55	7.0	2	1:10	2
胰蛋白酶	40	8.0	2	1:10	2
胃蛋白酶	40	2.5	2	1:10	2

1.3.5 单因素试验设计 加酶量对蛋白质提取率的影响:碱性蛋白酶的加酶量分别为 1%、2%、3%、4%、5%,料液比 1 g:10 mL,提取温度 50℃,搅拌提取时间 2 h, pH 值为 10.0。

料液比对蛋白质提取率的影响:料液比(g:mL) 分别为 1:5、1:8、1:10、1:15、1:20,加酶量 2%,提取温度 50℃,搅拌提取时间 2 h, pH 值为 10.0。

提取温度对蛋白质提取率的影响:提取温度分别为 35、40、45、50、55℃,加酶量 2%,料液比 1 g:10 mL,搅拌提取时间 2 h, pH 值为 10.0。

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,加酶量 2%,料液比 1 g:10 mL,提取温度 50℃, pH 值为 10.0。

pH 值对蛋白质提取率的影响:pH 值分别为 8.0、9.0、10.0、11.0、12.0,加酶量 2%,料液比 1 g:10 mL,提取温度 50℃,搅拌提取时间 2 h。

1.3.6 正交优化试验设计 根据单因素试验结果,影响大麦虫蛋白提取率的因素有加酶量、料液比、pH 值、温度、时间 5 个因素,因此,正交试验设计为 5 因素 4 水平,见表 2。采用 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) 进行正交试验,确定碱性蛋白酶提取大麦虫蛋白的最佳工艺。

表 2 大麦虫蛋白质提取率的正交试验因素水平

水平	A:加酶量(E/S,%)	B:pH 值	C:料液比(g:mL)	D:温度(℃)	E:时间(h)
1	2	9.0	1:8	40	1.5
2	3	10.0	1:10	45	2.0
3	4	11.0	1:15	50	2.5
4	5	12.0	1:20	55	3.0

2 结果与分析

2.1 不同蛋白酶对蛋白质提取率的影响

由于蛋白酶对肽键的作用具有专一性,故不同酶对大麦虫蛋白的水解效果就不相同。

由图 1 可知,对比 5 种酶对蛋白质提取量的影响,碱性蛋白酶辅助酶解时,蛋白质提取量最多。因此试验选择碱性蛋白酶作为大麦虫蛋白质提取的理想辅助酶,并将进一步研究其在不同条件下对大麦虫蛋白提取的影响,以优化其最佳提取工艺。

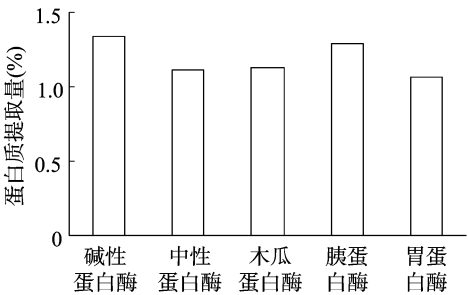


图 1 不同蛋白酶对大麦虫蛋白质提取率的影响

2.2 加酶量对蛋白质提取率的影响

从图 2 可知,在酶添加量为 1%~4% (E/S) 时,随着酶添加量的增多,蛋白的提取率显著增加,酶用量为 4% (E/S) 时达到最高峰;继续增大酶用量,大麦虫蛋白提取率开始降低。这是因为在底物浓度一定的情况下,反应速率与酶浓度成正

比例关系,提取率也会随加酶量的增加而增大<sup>[17]</sup>;在酶用量为 4% 时,酶与底物的作用达到饱和;但当酶浓度超过其饱和浓度时,底物浓度相对较低,碱性蛋白酶本身也是蛋白质,是底物的类似物,酶与底物竞争,会对酶产生抑制作用,使酶不能充分作用,而且酶添加量过大会增加提取成本,造成浪费。因此,碱性蛋白酶的最适添加量为 2% ~ 5% (E/S)。

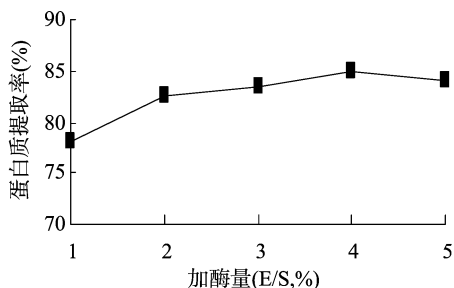


图2 加酶量对大麦虫蛋白质提取率的影响

### 2.3 料液比对蛋白质提取率的影响

由于不同的料液比,可以改变反应体系的微环境,影响大麦虫蛋白的提取率,因此本试验研究了不同料液比对大麦虫蛋白提取率的影响,结果见图 3。

从图 3 可以看出,随着料液比的增加,蛋白提取率也随之升高,但并不是无限提高。一方面可能是由于小的料液比有利于蛋白质和酶之间的相互接触,但料液比小,溶液的黏度大,将影响传质过程的进行,使原料中的蛋白质不能大量溶解出来;另一方面可能是由于大的料液比可以降低体系的黏度,加快传质过程,但同时料液比的增加降低了蛋白酶的浓度,从而降低了蛋白酶与大麦虫蛋白的相互作用的概率。因此,料液比选择在 1 g : 8 mL ~ 1 g : 20 mL 为宜。

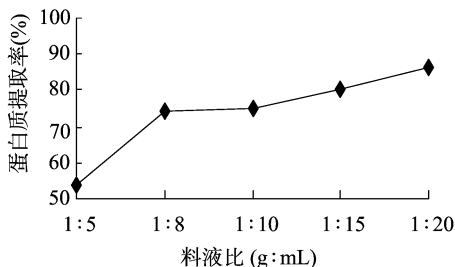


图3 料液比对大麦虫蛋白质提取率的影响

### 2.4 pH 值对蛋白质提取率的影响

在不同 pH 值下蛋白质的提取率见图 4。碱在大麦虫蛋白提取液中主要有 2 个作用:一是可以促进大麦虫蛋白的溶解;二是对碱性蛋白酶的活性有重要的影响。

由图 4 可知,随着 pH 值的增加,大麦虫蛋白提取率一直在增加。继续增加碱的用量使 pH 值达到 12.0 时,蛋白质提取率达到最高点,此条件下碱性蛋白酶的活性最强。因此,本试验选取 pH 值范围为 10.0 ~ 12.0,这与碱性蛋白酶厂家推荐的最适 pH 值范围正好相符。

### 2.5 反应温度对蛋白质提取率的影响

从图 5 可以看出,随着反应温度的增加,蛋白提取率也随之升高;当温度为 50 ℃ 时,大麦虫蛋白提取率最大;50 ℃ 以后随着温度的升高,提取率反而降低。这是因为在酶促反应体系中,虽然温度的升高可以加快反应速度,但是温度过高会

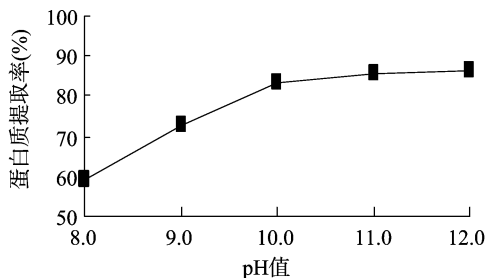


图4 pH 值对大麦虫蛋白质提取率的影响

使大麦虫蛋白质变性,使得碱性蛋白酶活力减弱,直至完全丧失活力,反应速度也会随着温度的升高迅速下降。因此,利用碱性蛋白酶提取大麦虫蛋白的温度选取 40 ~ 55 ℃ 为宜,这与碱性蛋白酶厂家推荐的最适温度范围 40 ~ 50 ℃ 正好相符。

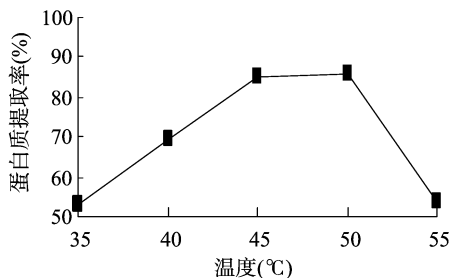


图5 反应温度对大麦虫蛋白质提取率的影响

### 2.6 反应时间对蛋白质提取率的影响

从图 6 可以看出,反应时间小于 2 h 时,蛋白质提取率逐渐上升,之后随着反应时间的增加,蛋白质的提取率趋于稳定并有下降趋势。这可能是因为 2 h 时,酶与底物已经反应完全,超过 2 h 以后提取的大麦虫蛋白质反而会受到碱性蛋白酶的过度水解。因而,本试验选取酶反应时间为 1.5 ~ 3.0 h。

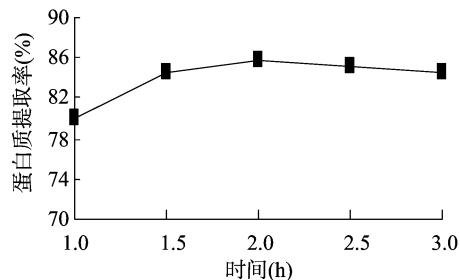


图6 反应时间对大麦虫蛋白质提取率的影响

### 2.7 正交试验结果

以加酶量、pH 值、料液比、反应温度、反应时间为 5 因素,按  $L_{16}(4^5)$  进行正交试验(表 2),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。

2.7.1 正交试验的极差分析 对试验结果进行极差分析,结果如表 3 所示。

以大麦虫蛋白提取率为考察指标,由表 3 极差  $R$  的大小可知,各因素对碱性蛋白酶提取大麦虫蛋白的影响主次顺序为 pH 值 > 料液比 > 加酶量 > 温度 > 时间,即 pH 值影响最大。由表 3 得出碱性蛋白酶提取大麦虫蛋白的最优条件为  $A_4B_4C_4D_3E_3$ ,即加酶量(E/S)为 5%、pH 值为 12、料液比为

表3 大麦虫蛋白质提取工艺正交试验的极差分析

试验号	A:加酶量	B:pH 值	C:料液比	D:温度	E:时间	提取率 (%)
1	1	1	1(1 : 8)	1(40)	1(1.5)	71.67
2	1	2	2	2	2	75.57
3	1	3	3	3	3	83.86
4	1	4	4	4	4	86.52
5	2	1	2	3	4	71.39
6	2	2	1	4	3	74.47
7	2	3	4	1	2	85.51
8	2	4	3	2	1	82.6
9	3	1	3	4	2	70.24
10	3	2	4	3	1	80.31
11	3	3	1	2	4	73.68
12	3	4	2	1	3	80.91
13	4	1	4	2	3	79.5
14	4	2	3	1	4	81.43
15	4	3	2	4	1	80.96
16	4	4	1	3	2	85.89
$k_1$	79.405	73.200	76.427	79.880	78.885	
$k_2$	78.493	77.945	77.207	77.838	79.302	
$k_3$	76.285	81.002	79.532	80.362	79.685	
$k_4$	81.945	83.980	82.960	78.047	78.255	
$R$	5.660	10.780	6.533	2.524	1.430	

1 g : 20 mL、温度为 50 ℃、提取时间为 2.5 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 75.01%,蛋白质提取率为 86.96%。

2.7.2 正交试验的方差分析 对“2.7.1”的极差数据进行方差分析,结果如表 4 所示。

表4 大麦虫蛋白质提取工艺正交试验的方差分析

误差来源	偏差平方和	自由度	$F$ 比	显著性
A	65.847	3	3.370	*
B	254.237	3	13.010	
C	103.168	3	5.279	
D	19.542	3	1.000	
E	4.500	3	0.230	
误差	19.54	3		

注: $F_{0.05}=9.280$ , $F_{0.01}=29.500$ ;“\*”表示对试验过程影响显著。

表 4 方差分析结果表明,pH 值是大麦虫蛋白质提取试验过程的显著因素,加酶量、温度、时间和料液比均为不显著因素。

3 结论

5 种酶制剂对大麦虫蛋白提取率的影响能力依次为碱性蛋白酶>胰蛋白酶>木瓜蛋白酶>中性蛋白酶>胃蛋白酶,因此碱性蛋白酶是提取大麦虫蛋白的理想酶制剂。

各因素对碱性蛋白酶提取大麦虫蛋白的影响主次顺序为 pH 值>料液比>加酶量>温度>时间,即 pH 值影响最大,时间最小。由正交试验得出大麦虫蛋白的最佳提取工艺为加酶量(E/S)为 5%、pH 值为 12.0、料液比为 1 g : 20 mL、温度

为 50 ℃、提取时间为 2.5 h,在此条件下,所得蛋白质产品的粗蛋白含量 75.01%,蛋白质提取率为 86.96%。

试验以碱性蛋白酶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。

得到的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原料的破碎程度和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]Finke M D. Gut loading to enhance the nutrient content of insects as food for reptiles:A mathematical approach[J]. Zoo Biology,2003,22 (2):147-162.

[2]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.

[3]Abayomi P A,Rotimi E. Aluko functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed protein isolate[J]. Food Chemistry,2011,128(4):902-908.

[4]范方宇,阚欢,郭安,等. 澳洲坚果蛋白质提取及多肽的制备[J]. 农业机械,2011(35):131-135.

[5]常银子,王丽霞,仲山民,等. 酶法提取芋艿蛋白质工艺[J]. 食品研究与开发,2011,32(3):19-22.

[6]冯磊,麻成金,黄伟,等. 酶法提取茶叶籽中蛋白质工艺优化[J]. 中国食物与营养,2012,18(5):48-52.

[7]李新华,富艳鑫,郑煜焱. 米糠蛋白提取工艺条件的优化[J]. 食品科学,2010,31(22):251-254.

[8]张晓平,冯涛,赵世锋,等. 酶法提取燕麦蛋白的研究[J]. 食品科技,2009,34(5):170-174.

[9]Latif S,Anwar F,Abdullah I,et al. Aqueous enzymatic process for oil and protein extraction from moringa oleifera seed[J]. European Journal of Lipid Science and Technology,2011,113(8):1012-1018.

[10]Shao B Z,Zhang W S,Ying X. Downstream processes for aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein hydrolysates[J]. Journal of the American Oil Chemists Society,2007,84(7):693-700.

[11]鲁晓翔,王绍树,张明春. 酶法水解蚂蚁蛋白的研究[J]. 天津商学院学报,1997(2):17-21.

[12]仲义,史树森,梁煜赫,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.

[13]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.

[14]中华人民共和国卫生部. GB5009.5—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.

[15]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.

[16]罗赞,吴卫国,何翰. 黄粉虫蛋白质酶法提取的研究[J]. 农产品加工,2009(4):68-71.

[17]廖珍龙,陈涛,陈丽梅,等. 米渣蛋白质提取纯化的技术研究[J]. 粮食与饲料工业,2010(3):21-24.