

文章编号:1003-8701(2009)03-0058-03

不同方法提取昆虫蛋白质效果比较

仲 义¹, 史树森², 梁煊赫¹, 高华援^{1*}

(1. 吉林省农业科学院经济作物所, 吉林 公主岭 136105; 2. 吉林农业大学, 长春 130118)

摘 要: 本试验以黄粉虫为试验材料, 对昆虫蛋白质的提取方法进行筛选。采用的提取方法共 4 种, 分别为碱提蛋白法、盐提蛋白法、胰蛋白酶提蛋白法和 Tris-HCl 提蛋白法。经过试验数据分析, 得出最佳提取方法为胰蛋白酶提蛋白法, 碱提蛋白法和 Tris-HCl 提蛋白法次之, 盐提蛋白法效果最差。

关键词: 黄粉虫; 昆虫蛋白质; 提取方法

中图分类号: S89

文献标识码: A

Comparison of Effect of Extract Insect Protein with Different Methods

ZHONG Yi¹, SHI Shu-sen², LIANG Xuan-he¹, GAO Hua-yuan^{1*}

(1. Institute of Economic Plants, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Fanjiatun 136105;

2. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Using yellow mealworm as the tests materials, the extract methods of insect protein were screened in the experiment. The method of extraction divided into four kinds, i.e., alkali extract method, salt extract method, trypsin extract method and Tris-HCl extract method. After the analysis of testing data, it was concluded that the best method of extraction was trypsin extract method, alkali extract method and Tris-HCl extract method was the second, and salt extract method was the worst.

Key words: Yellow mealworm; Insect protein; Extract method

随着科学技术的发展, 人们清楚地认识到, 昆虫是极好的蛋白质资源。昆虫含有丰富的蛋白质及多种营养素, 有很好的食用和饲用价值^[1-2]。昆虫蛋白是一个很有前景的食物来源, 昆虫虫体粗蛋白含量多在 50%~70%, 为鸡、猪肉、鸡蛋、鱼的 2~3 倍^[3-4]。而且蛋白质中富含人体必需的各种氨基酸, 蛋白质是生命的构成物质^[5]。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, 寻找蛋白质资源补充未来粮食的不足, 为现代畜牧业提供充足的饲用蛋白^[6-7], 已成为摆在我们面前的一项迫切任务。

1 材料和方法

收稿日期: 2009-02-11

作者简介: 仲 义(1980-), 男, 硕士研究生, 研究实习员, 主要从事马铃薯育种及栽培研究。

通讯作者: 高华援, 研究员, E-mail: ghy6413@163.com

1.1 试验材料

1.1.1 供试昆虫

供试昆虫由吉林农业大学农学院资源昆虫研究室提供的黄粉虫实验种群, 在常规条件下饲养并适时取样。

1.1.2 蛋白质提取试剂与仪器设备

试剂: 氢氧化钠(分析纯)、氯化钠(分析纯)、胰蛋白酶(化学纯, 上沪试剂)、三羟甲基氨基甲烷(Tris, 上海惠世)、蒸馏水。

仪器: FSH-2 型可调高速匀浆器(江苏荣华)、PHS-25 数字精密酸度计(上海虹益)、Centrikon T-42K 低温离心机(日本)、万分之一电子天平、移液管、离心管、WMK-02 型温度控制器、隔水式电热恒温培养箱。

1.2 试验方法

1.2.1 碱提蛋白法

蛋白质可溶于偏离其等电点的稀碱中, 在 pH

值接近其等电点时又可析出。精确称取一定量的试虫样本,加入 NaOH 溶液(溶液的浓度与固液比设 5 个梯度),在 10 000 r/min 下匀浆 3 min。经过一定的抽提时间(设 5 个梯度),一定的抽提温度(设 5 个梯度)。用 10%的 HCl 调节 pH 到 4.5 左右,可见明显的沉淀析出。再经过 10 000 r/min 离心 4 min 后得到粗盐蛋白。最后将盐蛋白经透析得到去盐蛋白,去盐蛋白在 60℃下烘干至恒重。

1.2.2 盐提蛋白法

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。精确称取一定量的试虫,加入 NaCl 溶液(溶液的浓度与固液比设 5 个梯度),在 10 000 r/min 下匀浆 3 min。经过一定的抽提时间(设 5 个梯度),一定的抽提温度(设 5 个梯度)。用 10%的 HCl 调节 pH 到 4.5 左右,可见明显的沉淀析出。再经过 10 000 r/min 离心 4 min 后得到粗盐蛋白。最后将盐蛋白经透析得到去盐蛋白,去盐蛋白在 60℃下烘干至恒重。

1.2.3 胰蛋白酶提蛋白法

酶溶法就是用生物酶将细胞膜消化溶解的方法,利用此方法处理细胞必须根据细胞的结构和化学组成选择适当的酶。胰蛋白酶可在低浓度下溶解蛋白质,但胰蛋白酶浓度过高会使提取的蛋白质失活变性。精确称取一定量的试虫,加入胰蛋白酶和蒸馏水(酶的质量和固液比各设 5 个梯度),在 10 000 r/min 下匀浆 3 min。用 0.25 mol/L (1%)的 NaOH 溶液调至 pH 为 7.0,经过一定的酶解时间(设 5 个梯度),一定的酶解温度(设 5 个梯度)。然后升温至 70℃杀酶 0.5 h,置冰箱中冷藏过夜。最后将虫渣过滤,在 80℃下烘干,得到酶法提取的粗蛋白质。去盐蛋白在 60℃下烘干至恒重。

1.2.4 Tris- HCl 提蛋白法

精确称取一定量的试虫,加入 Tris- HCl 溶液(溶液的浓度与固液比设 5 个梯度),在 10 000 r/min 下匀浆 3 min。经过一定的抽提时间(设 5 个梯度),一定的抽提温度(设 5 个梯度)。用 10%的 HCl 调节 pH 到 4.5 左右,可见明显的沉淀析出。再经过 10 000 r/min 离心 4 min 后得到粗盐蛋白。最后将盐蛋白经透析得到去盐蛋白。去盐蛋白在 60℃下烘干至恒重。试验的每种处理方法取 3 次重复。测得每种方法得到的粗蛋白质质量。

1.3 蛋白质含量的测定

凯氏定氮法

①消化:称取测试样品 0.010 0~0.030 0 g,置于 50 mL 凯氏瓶中。然后加入 8 mL 浓硫酸,轻轻摇匀,瓶口放一弯颈小漏斗,在电炉上加热,消煮过程中可少量添加过氧化氢,直到溶液呈无色或清亮后,停止加热并冷却至室温。将消煮液无损地洗入 100 mL 容量瓶中,用水定容,摇匀。

②蒸馏:取定容后的消煮液 5 mL,加入到凯氏蒸馏装置中,再加入 10 mL 氢氧化钠溶液并将加样小烧杯水封。取加入硼酸指示剂的 250 mL 三角瓶接取蒸馏出的氨,当指示剂变色时开始计时,5 min 后停止。依次重复操作。

③滴定:全部蒸馏完毕后,用 0.010 0 mol/L 标准盐酸滴定各三角瓶中收集的氨量,直至硼酸指示剂混合液由绿色变回淡紫红色,即为滴定终点。

④结果计算:

- W(N)=C× (V- V₀)× M× T_s× 10⁻³× m⁻¹× 100
- W(N)——样品中 N 的质量分数, %;
- C——HCl 标准溶液的浓度, mol/L;
- V——滴定试样时消耗 HCl 标准溶液的体积, mL;
- V₀——空白试验消耗 HCl 标准溶液的体积, mL;
- M——N 的摩尔质量, 14 g/mol;
- M——烘干试样的质量, g;
- T_s——分取倍数, 消煮液总体积 / 吸取试液体积 =100/5。

1.4 试验数据分析方法

试验数据处理使用《实用统计分析及其 DPS 数据处理系统》和 DPS 数据处理系统软件,进行随机区组设计的单因素试验统计分析,得到其显著性水平。

2 结果分析

2.1 不同提取方法提取物得率的比较

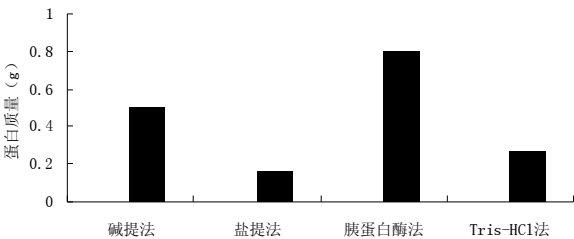


图 1 不同方法提取蛋白质质量的比较

如图 1 所示,用 4 种不同方法提取昆虫蛋白质所得粗蛋白质量,胰蛋白酶法所得粗蛋白质量

最高，均值为 0.801 8 g。其次是碱提法和 Tris- HCl 法 ,盐提法最低 ,均值为 0.155 1 g。

通过 DPS 数据处理系统显著性分析 ,4 种方法在 5%和 1%水平上均差异显著。

表 1 提取物质量的显著水平

方法	提取物质量(g)			均值	标准差	显著性水平	
碱提法	0.507 0	0.506 8	0.487 7	0.500 5	0.011 1	a	A
盐提法	0.184 5	0.130 9	0.149 8	0.155 1	0.027 2	b	B
胰蛋白酶法	0.807 3	0.817 8	0.780 4	0.801 8	0.019 3	c	C
Tris- HCl 法	0.284 3	0.249 0	0.276 4	0.269 9	0.018 5	d	D

2.2 不同提取方法所得提取物蛋白质百分含量的比较

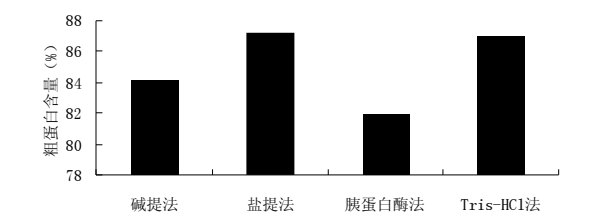


图 2 不同方法提取粗蛋白的百分含量

如图 2 所示 ,4 种不同提取方法所得蛋白质百分含量 ,盐提法所得蛋白质百分含量最高 ,均值为 86.933 9% ,Tris- HCl 法和碱提法次之 ,胰蛋白酶提法所得蛋白质百分含量最低 ,均值为 81.876 5%。

4 种方法在 5%显著水平上 ,碱提法和盐提法、胰蛋白酶提法、Tris- HCl 法间无显著差异 ,而胰蛋白酶提法与 Tris- HCl 法和盐提法间差异显著 ;在 1%显著水平上 ,4 种方法间均差异不显著。

表 2 提取物百分含量的显著水平

方法	重复 1	重复 2	重复 3	均值	标准差	显著性水平	
碱提法	86.112 5	82.835 4	83.463 3	84.137 1	1.739 3	ab	A
盐提法	91.175 4	87.495 2	82.983 3	87.218 0	4.103 1	a	A
胰蛋白酶法	82.660 8	80.904 4	82.064 4	81.876 5	0.893 1	b	A
Tris- HCl 法	89.188 6	86.900 1	84.712 9	86.933 9	2.238 0	a	A

2.3 不同提取方法的蛋白质得率比较

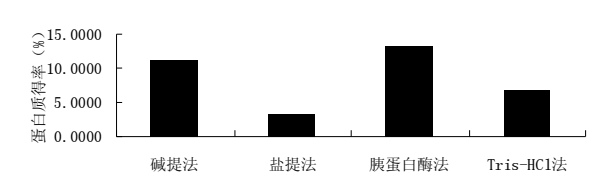


图 3 不同方法提取蛋白质得率的比较

如图 3 所示 ,4 种不同提取蛋白质方法所得蛋白质得率 ,胰蛋白酶提蛋白法得率最高 ,均值为 13.381 1% ,碱提法和 Tris- HCl 法次之 ,盐提蛋白法得率最低 ,均值为 3.188 9%。

由表 3 可知 ,4 种方法在 5%和 1%显著水平上均差异显著。

表 3 蛋白质得率的显著水平

方法	重复 1	重复 2	重复 3	均值	标准差	显著水平	
碱提法	11.223 0	11.121 8	11.200 6	11.181 8	0.053 1	b	A
盐提法	3.139 4	3.375 2	3.052 0	3.188 9	0.167 2	d	B
胰蛋白酶法	13.636 0	13.182 4	13.324 8	13.381 1	0.232 0	a	C
Tris- HCl 法	6.880 9	6.733 8	6.756 3	6.790 3	0.079 2	c	D

3 结论与讨论

3.1 结论

以鲜虫为基质提取蛋白质 ,胰蛋白酶提蛋白法得率最高 ,其次为碱提蛋白法和 Tris- HCl 提蛋白法 ,盐提蛋白法得率最低。运用 DPS 数据处理系统进行分析得知 ,碱提法、盐提法、胰蛋白酶法和 Tris- HCl 法 4 种方法蛋白得率均差异显著。表明在现有条件下 ,胰蛋白酶提蛋白法最佳 ,而盐提蛋白法最差。

3.2 讨论

本研究首次对 4 种方法提取昆虫蛋白效果进

行系统比较研究^[8] ,以鲜虫作为基质提取昆虫蛋白效果与李广宏等对家蝇蛋白质提取研究结果相一致。胰蛋白酶提蛋白法优于碱提法的结论与刘怀如等对黄粉虫有效物质的综合提取及提取方法的比较研究结果相似。在 4 种提取昆虫蛋白质方法中 ,胰蛋白酶提蛋白法得率最高 ,其次为碱提蛋白法和 Tris- HCl 提蛋白法 ,盐提蛋白法得率最低。这一结果与冀宪领等^[9]对黄粉虫蛋白质的提取工艺研究的盐提法优于碱提法的结果完全不同 ,原因有待进一步探讨。应用 Tris- HCl 法提昆虫蛋白在以往的文献中未见报道 ,从本研究结果看 ,提取昆虫蛋白质得率高于盐提法 ,(下转第 64 页)

[3] 吴玉萍,王东丹,杨金辉.离子色谱法检测烟叶中的 NO_3^- 、 NO_2^- 、 Cl^- [J]. 化学分析计量,2002,11(2):32-33.

[4] 孔浩辉,李期盼,郭文,等.连续流动分析法测定烟草中的氯含量[J].烟草科技,2004(4):26-28.

(上接第 29 页)成为肥料行业生产和农资消费的热点,从而为绿色食品、有机食品产业化创造良好条件。通过有益微生物的处理将农作物秸秆、畜禽粪便等有机废弃物转变成生物有机肥,使之无害化、资源化,解决了种植、养殖业的后顾之忧,同时也增加了畜禽产品的附加值,是一举多得的事情。同时,秸秆通过非病原微生物作用还田具有提高土壤有机质含量,改善土壤物理性状,增加土壤微生物,使土壤变得疏松易于耕种,减少病虫害的发生。正确使用生物有机肥,可以提高农产品的产量和品质,具有很好的生态效益和经济效益。因此,生物有机肥工厂化生产对畜禽养殖业、肥料加工和种植业都会产生良好的经济效益和社会效益。使农业生产走可持续发展的道路。

参考文献:

[1] 钟希琼,王惠珍,邓日烈,等.生物有机肥对蔬菜生理性状和品质的影响[J].佛山科学技术学院学报(自然科学版),

(上接第 43 页)在接蜂 36 h 后取到的寄生卵样本中,没有未寄生的空瘪卵现象,但在预蛹后期调查寄生率时,发现此时卵的内容物较多都化成水状,最后调查寄生率时随接蜂时间增加略有下降,是因为蜂种长时间产卵带入空气中的病菌,还是因为单卵头数过多出现生存竞争,最终不能发育成赤眼蜂,有待于进一步研究。

由于本实验只是在 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、相对湿度 80% $\pm 5\%$, 寄主卵与蜂种比为 14:1 的条件下繁殖的,并且只是 TC 螟黄赤眼蜂品系得出的结论,故在实际生产和应用中还应考虑不同的品系、接蜂温度、湿度、接蜂倍数等综合因素,以最小的投入换取最大的经济效益和社会效益。

本实验初步明确接蜂时间对赤眼蜂的繁殖会产生影响,找出繁殖该蜂比较适宜的接蜂时间,但还没从根本上解决螟黄赤眼蜂在柞蚕卵上寄生率

(上接第 60 页)而且该方法可更好地保持蛋白质的活性,可作为提取功能蛋白质的方法。

参考文献:

[1] 吕文彦,娄国强.昆虫蛋白质资源的开发利用概况[J].河南职技师院学报,1996,24(4):7-10.

[2] 罗科.昆虫蛋白质资源开发利用[J].农牧情报研究,1990(5):52-53.

[3] 张传溪.资源昆虫[M].上海:上海科学技术出版社,1990,107-110.

[4] 原国辉,郑祥义.食用昆虫蛋白资源的开发利用概况[J].昆虫知识,1991(2):122-124.

[5] 杜瑞华,周明松.连续流动分析法在烟草分析中的应用[J].中国测试技术,2007,33(3):76-78.

[6] 刘学芝,韩富根,李高等.烟叶中烟碱、钾、氯常规法测定前处理的改进初探[J].河南农业大学学报,2004,38(3):267-270.

2005,2(2):74-76.

[2] 丁平,潘超美,徐鸿华.不同生物有机肥料对巴戟天主要有效成分的影响[J].现代中药研究与实践,2003,17(4):21-22.

[3] 王玉时,李宏松,胡茶根.安徽农学通报,2003(2):67-68.

[4] 王立刚,李维炯,邱建军,等.生物有机肥对作物生长、土壤肥力及产量的效应研究[J].土壤肥料,2004(4):12-16.

[5] 张敏,王正银.生物有机肥料与农业可持续发展[J].磷肥与复肥,2006(2):58-59.

[6] 徐福乐,纵明,杨峰,等.生物有机肥的肥效及作用机理[J].耕作与栽培,2005(6):8-9.

[7] 张连忠,路克国,王宏伟,等.重金属和生物有机肥对苹果根区土壤微生物的影响[J].水土保持学报,2005(2):92-95.

[8] 李俊,姜昕,李力,等.微生物肥料的发展与土壤生物肥力的维持[J].中国土壤与肥料,2006(4):1-5.

[9] 蔡燕飞,廖宗文.FAME 法分析施肥对番茄青枯病抑制和土壤健康恢复的效果[J].中国农业科学,2003(8):922-927.

[10] 刘国顺,彭华伟.生物有机肥对烤烟土壤肥力及生长发育的影响[J].耕作与栽培,2004(3):29-31.

低的问题,今后还应在种下遗传分化和蜂种选育方面做进一步研究,选育出更适宜柞蚕卵繁殖的螟黄赤眼蜂品系,以实现工厂化大量生产。

参考文献:

[1] 许建军,郭文超,何疆,等.新疆利用赤眼蜂防治玉米螟田间技术研究初报[J].新疆农业科学,2001,38(6):315-317.

[2] 刘万学,万方浩,郭建英,等.人工释放赤眼蜂对棉铃虫的防治作用及相关生态效应[J].昆虫学报,2003,46(3):311-317.

[3] 王克勤,黄元巨,王亚洲,等.应用人工卵繁殖螟黄赤眼蜂防治大豆食心虫的初步研究[J].黑龙江农业科学,1996(3):21-23.

[4] 郭良珍,冯荣杨,梁恩义,等.螟黄赤眼蜂对甘蔗螟虫的控制效果[J].西南农业大学学报,2001,23(5):398-400.

[5] 董本春,王常湘,高德语,等.螟黄赤眼蜂防治水稻二化螟的研究[J].植物保护,2001,27(4):45-46.

[6] 鲁新,李丽娟,张国红.接蜂倍数对螟黄赤眼蜂不同品系的影响[J].吉林农业科学,2004,29(1):32-34.

[7] 鲁新,李丽娟,张国红.温度对螟黄赤眼蜂不同品系的影响[J].吉林农业科学,2003,28(5):18-21.

[5] 谢保令.黄粉虫营养成分的分析[J].昆虫知识,1991,28(4):247-249.

[6] 刘高强,魏美才.昆虫蛋白饲料的开发利用[J].饲料研究,2002(10):13-14.

[7] 张泽生,姚国雄.家蝇幼虫作为人类潜在食物蛋白质资源的探索[J].食品工业科技,1997(6):67-69.

[8] 许士国,林育真,战新梅.三种昆虫蛋白质、氨基酸和脂肪酸的比较研究[J].营养学报,2000,22(4):353-355.

[9] 冀宪领,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.