

4 种方法制备蝉蛹蛋白质效果的比较

张巳轩¹ 徐芊芊¹ 孙长婷¹ 张 倩¹ 任晶晶¹ 湛孝东^{1,2} 李朝品^{1,2}

(皖南医学院 1.活性生物大分子研究安徽省重点实验室;2.医学寄生虫学教研室,安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的:比较4种方法提取蝉蛹蛋白质效果的差异。方法:以蝉蛹为原料,通过控制变量法进行预实验,筛选出碱提取法、盐提取法、酶提取法以及水提取法这4种方法在不同测试因素下蛋白质收率最高的实验条件,并以该条件作为各个方法的最优条件,利用最优条件提取蝉蛹蛋白质并测定蛋白质含量。结果:蛋白质收率为碱提取法41.62%、盐提取法6.77%、酶提取法73.02%、水提取法69.35%。结论:酶提取法收率最高,其次是水提取法、碱提取法,盐提取法收率最低。

【关键词】蝉蛹;蛋白质;提取;制备

【中图分类号】R 282.74 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2018.06.027

Comparing the effects of four techniques in extracting cicada pupa protein

ZHANG Sixuan XU Qianqian SUN Changting ZHANG Qian REN Jingjing ZHAN Xiaodong LI Chaopin

Anhui Provincial Key Laboratory for Active Biological Macro-molecules Research ,Wannan Medical College ,Wuhu 241002 ,China

【Abstract】Objective: To compare the effect of four techniques in extraction of the protein from cicada pupa. **Methods:** Preliminary experiment was performed via controlling the variable using cicada pupa as raw material to determine the optimal extracting conditions for the four techniques ,including alkali extraction ,salt extraction ,enzyme extraction and water extraction. Then the optimal conditions were used to extract the protein from cicada pupa ,and the protein concentration was measured. **Results:** The yield of protein by alkali ,salt ,enzyme and water extraction was 41.62% ,6.77% ,73.02% and 69.35% , respectively. **Conclusion:** Of the four techniques ,enzyme extraction can yield the highest protein ,whereas salt ,the lowest.

【Key words】cicada pupa; protein; extraction; preparation

蝉蛹(Cicada pupa)又称知了猴、蝉猴、蝉龟,多生活在热带、亚热带和温带区域,属于节肢动物门昆虫纲半翅目蝽科,是蝉不完全变态发育(卵、幼虫、成虫)过程中的幼虫阶段。蝉蛹是集医学价值与营养价值于一身的一种昆虫资源,蝉蛹含有具有药理活性的物质,可以提高人体免疫力,延缓机体衰老,蝉蛹蜕下的壳富含甲壳素、异黄质蝶呤、赤蝶呤、腺苷三磷酸酶,入药常用于治疗外感风热、咽喉肿痛等症^[1];蝉蛹含有丰富的蛋白质和多种氨基酸^[2],是一种高营养价值的食品资源。目前对黄粉虫^[3-4]、蚕蛹^[5-6]等昆虫已有较多的研究,但对于蝉蛹的研究报道并不多见,对蝉蛹蛋白质的利用范围也较局限,易造成资源浪费,因此需要一种较好的蛋白质提取方法,将蝉蛹蛋白资源实现最大化利用,为蝉蛹的综合利用提供方法。本实验主要用碱提取法、盐提取法、酶提取法和水提取法提取蝉蛹蛋白,并初步评估各种方式提取蛋白质效果的差别。

1 材料与方法

1.1 虫源 蝉蛹购自皖北农贸市场,清洗并分选新鲜虫体,摘除头和足后,剥去皮壳,经冷冻干燥、磨碎、40目/时过筛和石油醚脱脂^[7]等,制备成粉末备用。

1.2 试剂与仪器 蒸馏水、磷酸、无水乙醇、石油醚、氢氧化钠、氯化钠、尿素等试剂均为分析纯,购自无锡展望化工。胰蛋白酶(猪胰)、牛血清蛋白、考马斯亮蓝G-250购自Sigma公司。HH-3数显恒温水浴锅(江苏金坛市亿通电子有限公司),DHG-9070A数显不锈钢鼓风干燥箱(上海索谱仪器有限公司制造),BS 224S电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司),BSXT-02索式提取器(上海比朗仪器制造有限公司),SIMFD8-3冻干机(北京博医康实验仪器有限公司),Sigma 3-18KS高速冷冻离心机(北京博励行仪器有限公司),XHF-高速匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司),U2800紫外分光光

收稿日期:2018-02-06

作者简介:张巳轩(1994-),女,2013级临床医学专业本科生,(电话)18375325823,(电子信箱)1248475430@qq.com;

湛孝东,男,副教授,(电子信箱)xdzhan@126.com,通信作者。

度计(尤尼科上海仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 碱提取法 取 3 g 的脱脂蝉蛹粉,在一定的碱浓度(预实验设置 5 个浓度梯度)和固液比(预实验设置 5 个固液比梯度)的条件下,在一定温度(预实验设置 5 个温度梯度)下提取一定的时间(预实验设置 5 个时间梯度)将水解液转移到离心管,以 4 000 r/min 离心 20 min 弃沉淀,取上清液,用稀盐酸将上清液调至蝉蛹蛋白质等电点处(pH=3.5),再次以 4 000 r/min 离心 20 min 后弃去上清液取沉淀,沉淀放入冷冻干燥机中进行冷冻干燥,即获得蛋白质,测其质量。

1.3.2 盐提取法 取 3 g 的脱脂蝉蛹粉,在一定浓度的氯化钠溶液(预实验设置 5 个浓度梯度)和固液比(预实验设置 5 个固液比梯度)的条件下,在一定温度(预实验设置 5 个温度梯度)下提取一定的时间(预实验设置 5 个时间梯度)将水解液转移到离心管,在 4 000 r/min 条件下离心 20 min 弃沉淀,取上清液,用稀盐酸将上清液调至蝉蛹蛋白质等电点处(pH=3.5)再次以 4 000 r/min 离心 20 min 后弃去上清液取沉淀,将沉淀放入冷冻干燥机中进行冷冻干燥,即可获得蛋白质,称量质量。

1.3.3 酶提取法 称取 3 g 的脱脂蝉蛹粉,按照固液比加入一定量的蒸馏水(预实验设置 5 组固液比)和胰蛋白酶(预实验设定 5 组加酶量 w/w),用氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0,置于一定温度下水解(预实验设置 5 组温度梯度),在水解过程调 pH 将其稳定在 8.0,经过一定时间(预实验设置 5 组时间梯度)后,升温至 75 ℃灭酶 30 min,放于冰箱中静置 12 h,用 60 目筛过滤蛹粕,经冷冻干燥后得到蛋白质,放于分析天平测其质量。

1.3.4 水提取法 将鲜蝉蛹剥去壳放入烧杯中,加入适量蒸馏水,在高速分散器内切式匀浆机下将蝉蛹磨成匀浆,并加热到一定温度(预实验分设 75、80、85、90、95 ℃),用稀盐酸调至 pH 3.5 左右,静置 12 h 后,离心甩干冷冻干燥得粗蛋白质。将粗蛋白质用索式提取器进行脱脂,得到的蛋白质进行质量测定。

1.4 考马斯亮蓝法^[8-9]测定蛋白质含量

1.4.1 标准曲线的绘制 用牛蛋白血清配浓度为 1 g/L 的蛋白质标准液,分别取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 标准蛋白质溶液于试管中,每个试管分别补加 8 mol/L 尿素溶液至 1 mL,各取 0.1 mL 于新试管中并加入 5 mL 的考马斯亮蓝溶液,摇匀,在 595 nm 的波长下测定其吸光度,以吸光度为纵坐标,蛋白质

浓度为横坐标,绘制标准曲线。

1.4.2 样品蛋白质含量的测定 分别取用最优条件得到的蛋白质样品,每种样品蛋白质取 0.025 g,用 50 mL 的 8 mol/L 的尿素^[10]溶液进行溶解,取样 0.1 mL 根据上述步骤测定其吸光度,依据标准曲线计算出蛋白质含量,公式如下:① 蛋白质收率=(蛋白质产量/取样质量)×100%;② 蛋白质提取率=(蛋白质产量×蛋白质含量)/(取样质量×蝉蛹粉蛋白质含量)×100%。

2 结果

2.1 预实验筛选最优条件 本实验中用控制变量法测出不同条件对蛋白质收率的影响,不考虑不同条件之间的相互影响,以蛋白质收率高者作为该条件下的最优条件。

2.1.1 碱提取法 按照控制变量原则,依据加碱量、固液比、温度及时间变化得到蛋白质收率最高者分别作为各个变量的最优条件,则按照表 1 碱提取法最优条件是碱浓度 1.5%,固液比 1:20,温度 60 ℃,提取时间 1.5 h。

表 1 不同加碱量、固液比、温度和时间的碱提取法产量和收率

测试条件	条件梯度	产量/g	收率/%
加碱量/%	0.3	0.0017	0.057
	0.5	0.0045	0.15
	1.0	1.1076	36.92
	1.5	1.7877	59.59
	2.0	1.6577	55.26
固液比	1:10	1.2938	43.13
	1:12	1.5401	51.34
	1:15	1.6576	55.25
	1:20	1.9135	63.78
	1:25	1.6641	55.47
温度/℃	50	1.4488	48.29
	60	1.4749	49.16
	70	1.4350	47.83
	80	1.3495	44.98
	90	1.3296	44.32
时间/h	0.5	1.4266	47.55
	1.0	1.5854	52.85
	1.5	1.8895	62.98
	2.0	1.6047	53.49
	2.5	1.3028	43.43

2.1.2 盐提取法 按控制变量原则,分别取盐浓度、固液比、温度及时间变化得到蛋白质收率最高者分别作为各个变量的最优条件,则按表 2 盐提取法最优条件是盐浓度 1.5%,固液比 1:12,温度 50 ℃,提取时间 2 h。

表2 不同盐浓度、固液比、温度和时间的盐提取法产量和收率

测试条件	条件梯度	产量/g	收率/%
盐浓度/%	0.25	0.1145	3.82
	0.5	0.1696	5.65
	1.0	0.2794	9.31
	1.5	0.2951	9.84
	2.0	0.2542	8.47
固液比	1:8	0.0882	2.94
	1:10	0.0922	3.07
	1:12	0.0993	3.31
	1:15	0.0286	0.95
	1:20	0.0087	0.29
温度/℃	40	0.0722	2.41
	50	0.0734	2.45
	60	0.0554	1.85
	70	0.0410	1.37
	80	0.0176	0.59
时间/h	1	0.1272	4.24
	2	0.2794	9.31
	3	0.2410	8.03
	4	0.2129	7.10
	5	0.2347	7.82

2.1.3 酶提取法 根据控制变量原则,分别取加酶量、固液比、温度得到蛋白质收率最高者分别作为各个变量的最优条件,则按照表3酶提取法最优条件是加酶量1.5%,固液比1:25,温度40℃,由于随着提取时间的延长,其收率增加不明显,故选择提取时间为3h。

表3 不同加酶量、固液比、温度和时间的酶提取法产量和收率

测试条件	条件梯度	产量/g	收率/%
加酶量/%	0.3	1.6049	53.50
	0.5	1.6904	56.35
	1.0	1.8885	62.95
	1.5	1.9738	65.79
	2.0	1.9632	65.44
固液比	1:10	1.7337	57.79
	1:12	2.0804	69.35
	1:15	1.9802	66.01
	1:20	2.0793	69.31
	1:25	2.1481	71.60
温度/℃	35	1.8807	62.69
	40	2.1514	71.71
	45	1.9885	66.28
	50	1.9437	64.79
	55	2.012	67.07
时间/h	2	1.661	55.37
	3	1.9806	66.07
	4	1.9931	66.43
	5	2.0142	67.14
	6	1.9984	66.61

2.1.4 水提取法 按照控制变量原则,取温度作为变化条件得到蛋白质收率最高者作为温度这组变量的最优条件,则按照表4水提取法最优条件是温度90℃。

表4 不同温度的水提取法产量和收率

温度/℃	75	80	85	90	95
产量/g	2.7472	2.7740	2.7924	2.8547	2.4419
收率/%	27.47	27.74	27.92	28.55	24.42

2.2 样品蛋白质浓度测量结果 不同样品溶液吸光度不同,根据标准曲线计算出每种样品的蛋白质浓度。样品吸光度测量值、样品蛋白质浓度值如下。碱样品1:0.200、0.0779 g/L;碱样品2:0.218、0.0868 g/L;碱样品3:0.194、0.0750 g/L。盐样品1:0.178、0.0671 g/L;盐样品2:0.150、0.0533 g/L;盐样品3:0.103、0.0301 g/L。酶样品1:0.094、0.0257 g/L;酶样品2:0.084、0.0414 g/L;酶样品3:0.053、0.0055 g/L。水提取法样品1:0.107、0.0321 g/L;水提法样品2:0.086、0.0218 g/L;水提法样品3:0.074、0.0159 g/L。未脱脂样品:0.179、0.0676 g/L;脱脂后样品:0.120、0.0385 g/L。

2.3 最优条件的实验结果分析 每种方法以最优条件同时进行3组实验,数据见表5。将未脱脂干蝉蛹蛋白质含量(13.52%)与脱脂干蝉蛹蛋白质含量(7.7%)进行比较,脱脂后的蛋白质含量低于没有进行脱脂的蛋白质含量,说明有机溶剂在提取过程中可以造成蛋白质含量的丢失,因而高脱脂并且低蛋白质含量损耗的有机溶剂有待于进一步探究。

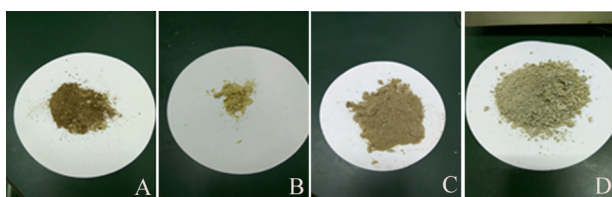
蛋白质收率均值进行比较:酶提取法收率最高为73.02%,碱提取法为41.62%,盐提取法效果最低,仅6.77%,水提取法收率(69.35%)仅次于酶提取法,表明水提取法也可以作为日后提取蝉蛹蛋白质的一种新办法,但需要注意进一步优化去除蝉蛹壳、皮等杂质的工艺,从而得到更纯的蛋白质。

不同方法提取蛋白质所得蛋白质含量也不同,其中碱提取法蛋白质含量最高,其平均值为15.98%,其余依次为盐提取法、水提取法,最低为酶提取法(平均值为3.47%)。根据蛋白质提取率之间的差异得出:碱提取法蛋白质提取率最高为86.88%,其余依次为水提取法、酶提取法,盐提取法蛋白质提取率最低(平均值为8.86%)。

将蛋白质外观进行对比,盐提取法所得蛋白质外观最好,而碱提取法更容易发生褐变(图1)。

表 5 最优条件的实验结果

	蝉蛹质量 /g	蛋白质产量 /g	产量均值 /g	蛋白质含量 /%	含量均值 /%	蛋白质收率 /%	收率均值 /%	蛋白质 提取率/ %	提取率 均值/ %
碱提取法	3	1.2387	1.2486±0.0115	15.58	15.98±1.00	41.29	41.62±0.39	85.15	86.88±4.74
		1.2422		17.36		41.41		93.35	
		1.2649		15		42.16		82.14	
盐提取法	3	0.1954	0.2032±0.0124	13.42	10.03±3.05	6.51	6.77±0.41	11.35	8.86±2.73
		0.2204		10.66		7.35		10.17	
		0.1939		6.02		6.46		5.05	
酶提取法	3	2.1783	2.1904±0.1044	5.14	3.47±1.72	72.61	73.02±3.48	48.47	33.91±16.87
		2.3241		4.16		77.47		41.85	
		2.0692		1.1		68.97		9.853	
水提取法	4.5181	2.8251	3.1333±0.2238	6.42	4.65±1.34	62.52	69.35±4.96	61.7	46.65±12.08
		3.3498		4.36		74.14		46.14	
		3.225		3.18		71.38		32.12	



A.碱提取法蛋白质; B.盐提取法蛋白质; C.酶提取法蛋白质; D.水提取法蛋白质

图 1 不同方法提取的蛋白质外观

3 讨论

近些年,人们逐渐重视昆虫食品的营养价值与医学价值,并对蚕蛹、黄粉虫等昆虫进行了较多的研究,但蝉蛹的研究报道少见,其作为一种利用价值高的昆虫资源,需要开发一种综合利用的方法。

用干蝉蛹提取蛋白质,其中酶提取法收率最高,其次是水提取法、碱提取法,盐提取法收率最低。在收率方面,用酶法制备蛋白质的效果最佳,盐法制备蛋白质的效果最差。本研究将4种方法制备蝉蛹蛋白质效果与其他文献结果进行比较,与仲义等^[11]用不同方法提取昆虫蛋白质和潘怡欧^[12]的昆虫蛋白质提取工艺比较研究得到类似的结论即胰蛋白酶提取蛋白法最佳,而盐蛋白法最差。与冀宪领等^[13]的黄粉虫蛋白质的提取工艺研究结果盐法优于碱法不同,其原因有待于进一步探究。与周建军等^[5]用简便方法提取蚕蛹蛋白质收率高的研究结果相同。

本研究尚未对各测试条件之间的影响进行实验,关于蛋白质在碱和酶中容易水解为可溶性组分以及一些蛋白为盐溶组分影响尚未涉及,有待进一步深入研究,对于蝉蛹蛋白的纯化及水解物多肽、氨基酸的医学价值可作为研究的新思路进行进一步探讨。

【参考文献】

[1] 宋少华,刘利娥,刘洁,等.蝉蛹营养成分分析与评价[J].食品研究与开发,2013,34(5):115-118.

[2] 宋少华.蝉蛹蛋白质的提取及酶解物抗氧化活性测定[D].郑州:郑州大学,2012.

[3] 刘怀如,杨兆芬,谭东飞,等.黄粉虫有效物质的综合提取及提取方法的比较[J].昆虫知识,2003,40(4):362-365.

[4] 黄雄伟.盐提法提取黄粉虫蛋白质工艺研究[J].食品与机械,2010,26(3):150-152.

[5] 周建军,赵桦.一种简便的提取蚕蛹蛋白新方法[J].天然产物研究与开发,2001,13(4):44-46.

[6] 湛孝东,施自伦,李朝品.蚕蛹复合氨基酸对人肝癌细胞 SMMC-7721 的抑制作用[J].天然产物研究与开发,2013,25(4):460-465.

[7] 李朝品,湛孝东,施自伦.蚕蛹蛋白提取研究[J].农产品加工(学刊),2011(2):26-27,35.

[8] 杨正坤,王秀丽,龙施华,等.考马斯亮蓝染色法测定大豆茎叶中蛋白质含量[J].湖北农业科学,2012,51(20):4610-4612.

[9] 郭颖娜,孙卫.蛋白质含量测定方法的比较[J].河北化工,2008,31(4):36-37.

[10] 肖茹.大豆分离蛋白质在二甲亚砜/尿素中溶解特性的研究[C].2004年全国高分子材料科学与工程研讨会论文集,2004.

[11] 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.

[12] 潘怡欧.昆虫蛋白质提取工艺的比较研究[D].吉林农业大学,2005.

[13] 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.

[14] 湛孝东,施自伦,李朝品.蚕蛹水解氨基酸对人肝癌细胞 Hep G2.2.15 的体外抑制作用的研究[J].齐齐哈尔医学院学报,2015,36(4):469-470.

[15] 包淑云,吴少云,李朝品,等.蚕蛹甲壳素的制备工艺研究[J].时珍国医国药,2012,23(3):697-698.