

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0972.2009.04.016

蚂蚁蛋白质提取方法的比较研究

李淑萍*, 徐心诚, 冯爱华

(商丘师范学院 生命科学系, 河南 商丘 476000)

摘要:以铺道蚁 (*Tetramorium caespitum*) 为实验材料, 采用正交试验法, 对蚂蚁蛋白质的提取条件进行了研究. 实验分别采用碱提蛋白法、盐提蛋白法、Tris-HCl 缓冲液提蛋白法等 3 种提取方法. 对其主要条件: 不同浓度、浸提温度、浸提时间、固液比以及 Tris-HCl 液的 pH 值等进行了研究. 结果表明, 碱提蛋白法的最佳条件为: 碱液浓度为 1%, 固液比为 1:15, 浸提时间为 60 min, 浸提温度为 80 °C; 盐提蛋白法的最佳条件为: 盐液浓度为 1.5%, 固液比为 1:15, 浸提时间为 60 min, 浸提温度为 50 °C; Tris-HCl 缓冲液提蛋白法的最佳条件为: pH 值为 8.3, 固液比为 1:15, 浸提时间为 90 min, 浸提温度为 20 °C. 在这 3 种方法中, 碱提蛋白法的蛋白质得率最高, 其次为盐提蛋白法, 而 Tris-HCl 缓冲液提蛋白法最低.

关键词:正交法; 蛋白质; 提取; 蚂蚁; 最佳条件

中图分类号: Q966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-0972(2009)04-0537-04

The Comparison Study on Methods of Extract Protein from Ant

LI Shu-ping*, XU Xin-cheng, FENG Ai-hua

(Department of Life Sciences, Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000, China)

Abstract: The extract method of protein from *Tetramorium caespitum* was investigated by the orthogonal test. Three extract methods, alkali treatment, salt treatment, and Tris-HCl buffer treatment were used in this study, respectively, and the factors for concentration, temperature, time, the ratio of solid to liquid and the pH for Tris-HCl buffer were analyzed. The results showed: the optimized condition for alkali treatment was a solid/liquid ratio of 1:15 in 1% NaOH solution for 60 min at 80 °C; the optimized condition for salt treatment was a solid/liquid ratio of 1:15 in 1.5% NaCl solution for 60 min at 50 °C; the optimized condition for Tris-HCl treatment was a solid/liquid ratio of 1:15 in Tris-HCl buffer (pH 8.3) for 90 min at 20 °C. Among the methods, the best protein yield was carried out by method of alkali treatment, followed by salt treatment and Tris-HCl buffer.

Key words: orthogonal method; protein; extract; ant; optimum condition

0 引言

蚂蚁是地球上数量最多的昆虫之一. 现代医学对蚂蚁的营养价值进行了分析和鉴定, 确认蚂蚁体内蛋白质含量高达 42% ~ 67%, 是鸡蛋的 4 倍, 牛奶的 6 倍, 含有 28 种游离氨基酸, 其中包括人体必需的 8 种氨基酸^[1-4], 蚂蚁不仅具有很高食用价值和药用价值, 而且开发潜力广阔, 我国已批准蚂蚁食品为新资源食品. 目前国内对黄粉虫及家蝇蛋白的提取工艺有所报道^[5], 蚂蚁蛋白质的提取极少报道^[6]. 如果把蚂蚁中的蛋白质分离提取出来, 将能给市场提供丰富优质的蛋白质来源, 可作为食品

的蛋白质强化剂、生产营养保健品或用做家畜的蛋白饲料^[7]等, 因此, 开拓蚂蚁蛋白质资源具有重要意义.

20 世纪, 人们提取动物蛋白主要是以有机溶剂提纯, 虽然产量较高, 但对含硫氨基酸破坏性较大, 灰分含量高, 品质差. 此后, 碱提法为人们广泛采用, 可是, 热碱提取使蛋白质变性, 严重影响产品品质, 而以低温提取则产量偏低^[8]. 本实验是在前人研究的基础上, 通过对蚂蚁蛋白质提取条件的研究, 为今后研究昆虫蛋白质提取和利用提供了可行的参考依据.

收稿日期: 2009-03-16; 修订日期: 2009-05-19; * 通讯联系人, E-mail: sqsp@163.com

基金项目: 河南省教育厅自然科学基金基础研究计划项目 (2007180039)

作者简介: 李淑萍 (1964-), 女, 河南偃师人, 教授, 主要从事昆虫生物化学研究.

1 材料与试剂

1.1 实验昆虫

蚁科铺道蚁 (*Tetramorium caespitum*), 采自商丘师范学院校园花园内。

1.2 蛋白质提取试剂材料与仪器设备

试剂: 氢氧化钠, 分析纯; 氯化钠, 分析纯; 三羟甲基氨基甲烷 Tris, 分析纯。

仪器: 电子天平, 万分之一, 上海精密科学仪器有限公司; 低温冷冻离心机, 常州国华电器有限公司; 微量加样枪, 数显恒温水浴锅, 常州国华电器有限公司。

1.3 蛋白质含量测定试剂与仪器设备

试剂: 95% 乙醇, 分析纯; 85% 磷酸, 分析纯; 小牛血清清蛋白, 分析纯; 考马斯亮蓝 G-250, 化学纯。

仪器: 723 型可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; 微量加样枪。

试剂的配制:

(1) 1 g/L 小牛血清清蛋白标准溶液的配制

精确称量 100 mg 小牛血清清蛋白溶于适量蒸馏水中, 在 100 mL 容量瓶中定容。

(2) 考马斯亮蓝 G-250 的配制

称取 100 mg 考马斯亮蓝 G-250, 溶于 50 mL 95% 乙醇中, 加入 85% 磷酸 100 mL, 最后用蒸馏水定容到 1 000 mL, 此溶液保存于棕色试剂瓶中。

2 实验方法

2.1 昆虫材料的处理

将洗净的蚂蚁用吸水纸擦干后放在托盘内, 摊成 2 cm 厚, 在 40 ~ 60 °C 下烘干 8 h 以上, 直至其质量恒重, 经研磨得蚂蚁粉 (60 目筛) 备用。

2.2 蛋白质的提取方法

本实验采用碱提蛋白法、盐提蛋白法和 Tris-HCl 缓冲液提蛋白法等 3 种提取方法。在单因素实验的基础上, 采用正交试验^[2,9-10], 正交的因素与水平详见表 1。其 3 种具体方法见表 2、表 3 和表 4。实验主要以蛋白质得率为评价指标进行评定。

2.2.1 碱提蛋白法

蛋白质可溶于偏离其等电点的稀碱中。精确称取 0.2 g 研磨好的蚂蚁粉, 按表 1 和表 2 进行实验, 经过一定的浸提时间 (设 3 个梯度), 一定的浸提温度 (设 3 个梯度), 4 000 r/min 离心 20 min 去

除蚁渣, 将上清液转至另一试管中即得蛋白质浸提液。

表 1 正交试验因素与水平

序号	A (浓度或 pH)	B (温度)	C (固液比)	D (时间)
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

表 2 碱提蛋白法测定因素与测定水平

Tab 2 The determined factor and level of the extract proteins method of alkali

水平	A/%	B/	C	D/min
1	0.5	60	1.5	30
2	1.0	70	1.10	60
3	1.5	80	1.15	90

2.2.2 盐提蛋白法

蛋白质可溶于盐溶液中, 称为盐溶作用, 常用的盐溶液是氯化钠溶液。精确称取 0.2 g 研磨好的蚂蚁粉, 按表 1 和表 3 进行实验, 经过一定的浸提时间 (设 3 个梯度), 一定的浸提温度 (设 3 个梯度), 4 000 r/min 离心 20 min 去除蚁渣, 将上清液转至另一试管中即得蛋白质浸提液。

表 3 盐提蛋白法测定因素与测定水平

Tab 3 The determined factor and level of the extract proteins method of salt

水平	A/%	B/	C	D/min
1	0.5	40	1.5	60
2	1.0	50	1.10	120
3	1.5	60	1.15	180

2.2.3 Tris-HCl 缓冲液提蛋白法

蛋白质可溶于 Tris-HCl 缓冲溶液中, 缓冲溶液可以抗衡蛋白质溶液中的 pH 值的改变, 对蛋白质的溶解度大, 破坏作用小, 对杂质溶解度很小。精确称取 0.2 g 研磨好的蚂蚁粉, 按表 1 和表 4 进行实验, 经过一定的浸提时间 (设 3 个梯度), 一定的浸提温度 (设 3 个梯度), 4 000 r/min 离心 20 min 去除蚁渣, 将上清液转至另一试管中即得蛋白质浸提液。

2.3 蛋白质含量的测定

采用考马斯亮蓝 G-250 法^[11]测定, 这一方法基于考马斯亮蓝 G-250 有红和蓝 2 种不同颜色的形式。在游离状态下, 最大光吸收在 488 nm, 当与

蛋白质结合后产生蓝色化合物,反应迅速而稳定。该化合物在 595 nm 下有最大光吸收,其光吸收与蛋白质的含量成正比,可检测 595 nm 的光吸收大小计算蛋白质的含量。

(1)标准曲线的制作:取 6 支干净的试管,按表 5 取样,充分混合后放置 2 min 用比色杯在 595 nm 波长下测光吸收值,记录各管测定的光密度 OD_{595} ,并作标准曲线。

表 4 Tris-HCl 缓冲液提蛋白法测定因素与测定水平

Tab 4 The determined factor and level of extract proteins method of Tris-HCl buffer solution

水平	A (pH值)	B /	C	D/min
1	7.6	20	1.5	60
2	7.9	30	1.10	90
3	8.3	40	1.15	120

表 5 标准曲线的制作

Tab 5 The manufacture of calibration curve

管号	1g/L 标准蛋白质液 /mL	蒸馏水 /mL	考马斯亮蓝 G-250 试剂 /mL	蛋白质含量 / μ g
1	0.00	1.00	5	0
2	0.02	0.98	5	20
3	0.04	0.96	5	40
4	0.06	0.94	5	60
5	0.08	0.92	5	80
6	0.10	0.90	5	100

(2)测定:吸取蛋白质提取液 0.01 mL,加蒸馏水 0.99 mL 和考马斯亮蓝 G-250 试剂 5 mL 充分混合放置 2 min 后在 595 nm 下纪录光吸收值 OD ,并通过标准曲线查得样品提取液中蛋白质的含量 $x(\mu\text{g})$,以标准曲线 1 号试管做对照。

(3)计算:

浸提液中蛋白质含量 $(\mu\text{g}) = x \times \text{提取液总体积 (mL)} / \text{测定时取样体积 (mL)}$ 。

式中 x 为在标准曲线上查得的蛋白质含量。

3 结果与分析

3.1 碱提蛋白法正交试验结果及极差分析

碱提蛋白法的正交试验结果见表 6 从表 6 正交试验结果和极差分析可知,各因素对蛋白质得率的影响力度为 $B > A > C > D$,即对碱提蛋白法影响最明显的因素是浸提温度,其次是碱浓度和固液比,浸提时间对其影响较小。综合各因素作用,碱提蛋白法提取蚂蚁蛋白的最佳条件为 $A_2B_3C_3D_2$,即以 1% 浓度的碱溶液,按 1:15 固液比,在 80 条件下搅拌浸提 60 min,浸提液中蛋白质得率为

135.75 $\mu\text{g/g}$

3.2 盐提蛋白法正交试验结果与极差分析

盐提蛋白法的正交试验结果见表 7 从表 7 正交试验结果和极差分析可知,各因素对蛋白质得率的影响力度为 $C > D > A > B$,即对盐提蛋白法影响最明显的因素是固液比,而盐浓度,浸提温度和浸提时间对其影响较小。综合各因素作用,盐提蛋白法提取蚂蚁蛋白的最佳条件为 $A_3B_2C_3D_1$,即以 1.5% 浓度的盐溶液,按 1:15 固液比,在 50 条件下搅拌浸提 60 min,浸提液中蛋白质的得率为 20.37 $\mu\text{g/g}$

表 6 碱提蛋白法的正交试验结果

Tab 6 The result of the orthogonal test with the extract proteins method of alkali

序号	A (浓度)	B (温度)	C (固液比)	D (时间)	得率 ($\mu\text{g/g}$)
1	1	1	1	1	13.40
2	1	2	2	2	32.53
3	1	3	3	3	88.72
4	2	1	2	3	57.87
5	2	2	3	1	87.47
6	2	3	1	2	120.69
7	3	1	3	2	89.18
8	3	2	1	3	17.29
9	3	3	2	1	94.05
K_1	134.65	160.45	151.38	194.92	
K_2	266.03	137.29	184.45	242.4	
K_3	200.52	303.46	265.37	163.88	
R	43.80	55.39	38.00	36.17	

表 7 盐提蛋白法的正交试验结果

Tab 7 The result of the orthogonal test with the extract proteins method of salt

序号	A (浓度)	B (温度)	C (固液比)	D (时间)	得率 ($\mu\text{g/g}$)
1	1	1	1	1	1.87
2	1	2	2	2	5.60
3	1	3	3	3	7.39
4	2	1	2	3	3.96
5	2	2	3	1	10.58
6	2	3	1	2	3.25
7	3	1	3	2	9.67
8	3	2	1	3	2.78
9	3	3	2	1	7.78
K_1	14.86	15.50	7.90	20.23	
K_2	17.79	18.96	17.34	18.52	
K_3	20.23	18.42	27.64	14.13	
R	1.79	1.15	6.58	2.03	

3.3 Tris-HCl 缓冲液提蛋白法正交试验结果与极差分析

Tris-HCl 缓冲液提蛋白法的正交试验结果见表 8 从表 8 正交试验结果和极差分析可知,各因素对蛋白质得率的影响力度为 $C > A > D > B$,即

Tris-HCl 缓冲液提蛋白法影响最明显的因素是固液比,其次是 pH 值和浸提时间,而浸提温度对其影响最小。综合各因素作用, Tris-HCl 缓冲液提蛋白法提取蚂蚁蛋白的最佳条件为 $A_3B_1C_3D_2$,即以 pH 值 8.3,按 1:15 固液比,在 20℃ 条件下搅拌浸提 90 min,浸提液中蛋白质的得率为 14.28 $\mu\text{g/g}$ 。

表 8 Tris-HCl 缓冲液提蛋白法的正交试验结果

Tab 8 The result of the orthogonal test with the extract proteins method of Tris-HCl buffer solution

序号	A (pH值)	B (温度)	C (固液比)	D (时间)	得率 ($\mu\text{g/g}$)
1	1	1	1	1	0.41
2	1	2	2	2	1.23
3	1	3	3	3	1.44
4	2	1	2	3	1.10
5	2	2	3	1	1.42
6	2	3	1	2	0.53
7	3	1	3	2	2.21
8	3	2	1	3	0.76
9	3	3	2	1	1.67
K_1	3.08	3.72	1.70	3.50	
K_2	3.05	3.41	4.00	3.97	
K_3	4.64	3.64	5.07	3.30	
R	0.53	0.07	1.12	0.22	

4 小结与讨论

本实验利用 3 种方法对蚂蚁蛋白质进行提取。在保持蛋白质较好特性的条件下,通过单一选择性试验分析可得出碱提蛋白法的最佳条件为:碱液浓度为 1%,固液比为 1:15,浸提时间为 60 min,浸提温度为 80℃,蛋白质得率为 135.75 $\mu\text{g/g}$;盐提蛋白法的最佳条件为:盐液浓度为 1.5%,固液比为 1:15,浸提时间为 60 min,浸提温度为 50℃,蛋白质

的得率为 20.37 $\mu\text{g/g}$; Tris-HCl 缓冲液提蛋白法的最佳条件为:pH 值为 8.3,固液比为 1:15,浸提时间为 90 min,浸提温度为 20℃,浸提液中蛋白质的得率为 14.28 $\mu\text{g/g}$ 。

通过对蛋白质得率的比较,得出碱提蛋白法明显优于盐提蛋白法和 Tris-HCl 缓冲液提蛋白法,但碱提蛋白法容易使蛋白质变性,对产品的风味和口感会产生不良影响,只能用于蛋白质产量方面的研究。若用于蛋白质功能性质和品质方面的研究,盐提蛋白法优于碱提蛋白法。虽然在实验中它的蛋白质得率低于碱提蛋白法,但它的浸提温度较低,浸提时间较短,从而能使蛋白质较好地保持天然状态,而 Tris-HCl 缓冲液提蛋白法虽然能较好保持蛋白质的活性,但由于它的蛋白质得率太低,而且在以往文献报道中很少用于昆虫蛋白质的提取,只在潘怡欧^[2]用来提取黄粉虫 (*Tenebrio molitor* L.) 和黄褐油葫芦 (*Teleogryllus desertus* Gorochov) 蛋白质中报道过,因此需要进一步的研究。故综合考虑蛋白质产量和品质等因素,较理想的蛋白质提取方法为盐提蛋白法。

对蛋白质得率偏低的原因分析可能包括材料的研磨程度,浸提过程中搅拌的程度,以及在提取时,残渣中也有一部分蛋白质未提尽(只提取一次)等。本文只对蛋白质提取过程的重要影响因素进行了单因素选择性实验,未考虑各因素之间的相互影响。因此,对这些蛋白质如何有效地回收以提高其得率,以及利用更先进的设计方法研究各种提取因素间的相互影响是今后需要进一步实验和研究。

参考文献:

- [1] 李静,穆魏,姜阳有,等. 几种常见昆虫蛋白质饲料的开发与利用 [J]. 吉林畜牧兽医, 2007, 28(3): 24-25, 28.
- [2] 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.
- [3] 陈晓鸣,冯颖. 资源昆虫学概论 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 7.
- [4] 郭成宇. 纯天然保健蚂蚁醋的研制 [J]. 中国调味品, 2003(5): 14-16.
- [5] 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.
- [6] 鲁晓翔,李占良,洪涛,等. 蚂蚁蛋白质提取研究 [J]. 食品科学, 1999, 20(8): 49-50.
- [7] 马惠钦,裴素俭. 用做饲料的昆虫资源 [J]. 昆虫知识, 1999, 36(5): 303-306.
- [8] 李爽,王静,张颖,等. 蜂王幼虫蛋白质提取工艺研究 [J]. 食品工业科技, 2006, 27(6): 128-129.
- [9] 肖连冬,丁海彦,薛艳. 麦芽蛋白的提取及其功能特性评价 [J]. 酿酒, 2003, 20(6): 85-87.
- [10] 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): 50-52.
- [11] 袁道强,黄建华. 生物化学实验和技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006: 184-185.

责任编辑:任长江