

# 黑水虻 (*Hermetia illucens*) 幼虫蛋白质的超声波辅助碱法提取及营养价值分析

徐佳豪<sup>1</sup>, 肖珊<sup>2</sup>, 胡文锋<sup>1\*</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)(2. 东莞理工学院生命健康技术学院, 广东东莞 523808)

**摘要:** 昆虫蛋白作为可持续的蛋白质来源, 可广泛应用于食品、保健品、饲料等领域, 有效替代传统动物蛋白, 对环境保护和缓解粮食危机具有积极作用。本研究以黑水虻 (*Hermetia illucens*) 幼虫为研究对象, 优化了超声波辅助碱法提取其蛋白质的工艺, 并分析了黑水虻幼虫蛋白质的营养价值。基于单因素试验结果, 采用 Box-Behnken 响应面试验设计以四因素、三水平进行蛋白质提取工艺优化。结合实际生产, 确定的最佳提取条件为, 超声波功率 342 W, 时间 60 min, NaOH 质量浓度 24.5 g/L, 液料比 56 (mL/g), 总体积 75 mL。理论预测的最高提取率为 82.61%。三次平行实验验证值为 80.37%。黑水虻幼虫蛋白质的等电点为 4.0。制备得到的黑水虻幼虫蛋白质样品的粗蛋白含量为 80.75%。黑水虻幼虫蛋白质的各种必需氨基酸含量均高于联合国粮食与农业组织 (FAO) 2013 年提出的成人氨基酸评分模式。该研究优化了一种超声波辅助碱法提取黑水虻幼虫蛋白质的方法, 制备的蛋白样品符合成人氨基酸需求, 对黑水虻和其他昆虫在食品工业中的应用提供一定价值。

**关键词:** 黑水虻; 昆虫蛋白; 超声波辅助提取; 响应面; 提取优化; 营养价值

文章编号: 1673-9078(2024)12-309-318

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.12.1375

## Ultrasound-assisted Alkaline Extraction of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Larval Protein and Analysis of Its Nutritional Value

XU Jiahao<sup>1</sup>, XIAO Shan<sup>2</sup>, HU Wenfeng<sup>1\*</sup>

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. School of Life and Health Technology, Dongguan University of Technology, Dongguan 523808, China)

**Abstract:** As a sustainable protein source, insect protein can be widely used in food, nutraceuticals, and feed to replace traditional animal protein, ensure environmental protection, and alleviate the food crisis. In this study, the ultrasound-assisted alkaline method was optimized for the extraction of protein from black soldier fly larvae and the nutritional value of the extracted protein was analyzed. Based on the results of single-factor experiments, the protein extraction process was optimized using a Box-Behnken response surface test designed with four factors and three levels. The optimal extraction conditions, which were determined in combination with the actual production, were as follows: ultrasonic power of 342 W,

引文格式:

徐佳豪,肖珊,胡文锋.黑水虻(*Hermetia illucens*)幼虫蛋白质的超声波辅助碱法提取及营养价值分析[J].现代食品科技,2024,40(12):309-318.

XU Jiahao, XIAO Shan, HU Wenfeng. Ultrasound-assisted alkaline extraction of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larval protein and analysis of its nutritional value [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(12): 309-318.

收稿日期: 2023-11-17

基金项目: 东莞理工学院高层次人才科研启动项目 (GC300501-139)

作者简介: 徐佳豪 (1999-), 男, 硕士, 研究生, 研究方向: 蛋白质营养、结构与功能, E-mail: 1582250420@qq.com

通讯作者: 胡文锋 (1964-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 昆虫与微生物的资源化利用, E-mail: wfhu@scau.edu.cn

time of 60 min, NaOH concentration of 24.5 g/L, a liquid-solid ratio of 56 mL/g, and a total volume of 75 mL. The theoretical maximum extraction rate was 82.61%. The validation value of the three parallel experiments was 80.37%. The isoelectric point of the larval protein from black soldier fly was 4.0 and the crude protein content was 80.75%. The content of various essential amino acids in black soldier fly larvae protein were higher than those of the amino acid scoring model for adults proposed by the Food and Agriculture Organization of the United Nations in 2013. In conclusion, an ultrasound-assisted alkaline extraction method for isolating black soldier fly larvae protein was optimized in this study. The prepared protein samples met the amino acid requirements of adults. Thus, black soldier fly and other insects may have application value in the food industry.

**Key words:** black soldier fly; insect protein; ultrasound-assisted extraction; response surface; extraction optimization; nutritional value

预计到 2050 年, 全球人口将达到 88~91 亿<sup>[1]</sup>。人口的持续增长将带来巨大的粮食需求。然而, 现有的农业用地已经无法满足人类对蛋白质的需求<sup>[2]</sup>, 开发绿色可持续的蛋白质资源迫在眉睫。昆虫具有高营养价值(蛋白含量可达 65%)、高饲料转化率、低温温室气体排放、低耗水量以及廉价的饲料等特点, 因此可以作为可持续替代传统食用蛋白质的选择<sup>[3,4]</sup>。

黑水虻 (Black Soldier Fly) 学名亮斑扁角水虻 (*Hermetia illucens*), 被认为是目前最具商业化生产蛋白质潜力的昆虫之一<sup>[5]</sup>。黑水虻幼虫 (Black Soldier Fly Larvae) 食性广泛, 能在多种农业废弃物上良好地生长<sup>[6]</sup>。黑水虻幼虫蛋白质 (Black Soldier Fly Larvae Protein) 的必需氨基酸组成满足世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 提出的成人需求<sup>[7-10]</sup>。已有研究表明, 黑水虻幼虫中最丰富的蛋白质是肌肉蛋白<sup>[11]</sup>。这些研究证实了黑水虻幼虫蛋白质部分替代传统动物蛋白可能性。

然而, 外观是人们不愿意食用昆虫的主要因素之一, 而将昆虫制作成富含蛋白质的粉末能提高接受度<sup>[12-14]</sup>。昆虫蛋白提取工艺中的杀灭、干燥等步骤还可以解决微生物安全的问题<sup>[15,16]</sup>。因此, 提取蛋白质或其他组分是利用昆虫作为食品的最好方法<sup>[7]</sup>。

黑水虻幼虫蛋白质的提取方法主要有碱提、酶提、缓冲溶液提及分级提取<sup>[7]</sup>。酶法可保留更多营养价值, 但成本高、时间长<sup>[17]</sup>。缓冲溶液提取不易破坏蛋白质结构, 但效率低。分级提取可以最完整地提取蛋白, 但步骤繁琐, 成本高<sup>[7]</sup>。碱法效率高、步骤简单、成本低廉, 显示出很高的工业规模适应性<sup>[4,7]</sup>, 但碱法提取时间过长会使昆虫蛋白颜色加深, 并产生异味<sup>[18]</sup>。超声波辅助提取 (Ultrasound-assisted Extraction, UAE) 是一种将超声波发生设备用于各种提取工艺的技术<sup>[19]</sup>。UAE 被认为是适用于大规模

生产的环境友好型方法<sup>[20,21]</sup>。超声波产生的空化效应会引起压力波动, 导致空泡爆炸, 进而破碎组织, 从而提供更强的传质<sup>[22]</sup>。因此与传统的单一提取工艺相比, UAE 可以缩短提取时间, 增大提取率, 减少溶剂消耗<sup>[19]</sup>。将 UAE 和传统碱法结合, 有望开发出易工业化、高提取率、耗时短的黑水虻幼虫蛋白质提取工艺。

因此, 本研究以黑水虻幼虫为研究对象, 将超声波辅助提取应用在其蛋白质的提取中, 并利用 Box-Behnken 响应面法优化提取率, 最后分析其主要组成成分和必需氨基酸含量。目的是开发超声波辅助碱法提取黑水虻幼虫蛋白质的工艺并分析黑水虻幼虫蛋白质的营养价值。黑水虻幼虫蛋白质作为可持续的蛋白质来源, 可有效替代动物蛋白, 应用于食品、保健品、饲料等领域。本文对昆虫蛋白的工业化利用提供一定价值, 昆虫蛋白的充分利用对环境保护和缓解粮食危机具有促进作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和材料

麦麸、玉米粉、苜蓿草粉, 购买自固原宝发农牧有限责任公司 (中国, 宁夏)。BCA (Bicinchoninic Acid Assay) 试剂盒, 购自碧云天生物技术有限公司 (P0010S, 中国, 上海)。除非另有规定, NaOH (分析纯)、石油醚 (60~90 °C 沸点组分) 和其余试剂均购自罗恩试剂 (中国, 上海)。

### 1.2 供试昆虫

黑水虻虫卵由生物源生物技术股份有限公司 (中国, 深圳) 友情提供。孵化后的幼虫以 70% (质量分数) 含水率的 Gainesville 饲料 (麦麸: 玉米粉: 苜蓿草粉 = 5:2:3) 饲喂至出现第一头预蛹。将幼虫

分离并断食以排空肠道。具体地,用去离子水每天浸泡 5 h,连续 3 d。然后用 95 °C 的去离子水漂烫 1 min 杀死幼虫,以防止褐化<sup>[8]</sup>,于 45 °C 真空干燥箱烘干,并粉碎。

虫粉的脱脂参考 Caligiani 等<sup>[7]</sup>的方法,并稍加优化。具体如下,一份虫粉和两份石油醚(V/V)在磁力搅拌器(MR Hei-Tec, Heidolph, 德国施瓦巴赫)上 650 r/min 搅拌 1 h,倾倒入含有脂肪的溶剂,该过程重复三次。脱脂虫粉中残留的溶剂在通风橱中蒸发一夜清除。脱脂虫粉恒重后,过 40 目筛,于 -20 °C 冰箱保存。

### 1.3 单因素实验

超声波辅助碱法提取黑水虻幼虫蛋白质的具体步骤如下,将一定料液比的脱脂虫粉和 NaOH 溶液混合,置于超声波细胞破碎仪(JY92-IIIN 型,新芝生物技术股份有限公司,中国宁波)中,探头直径 6 mm,伸入液面下 2 cm,超声波以脉冲模式,开 3 s 停 5 s 进行循环。依次研究超声波功率、提取时间、NaOH 质量浓度、液料比对黑水虻幼虫蛋白质提取率的影响。

提取完毕后将提取液使用冷冻离心机(3-30KS, SIGMA, 美国圣路易斯)在 4 °C 下进行离心,相对离心力为 3 944×g,离心时间为 10 min。随后取 1 mL 上清液,加入蒸馏水定容至 50 mL,得到待测液。使用 BCA 试剂盒测定待测液中的蛋白质含量。具体地,待测液加入显色液反应后用酶标仪(Spark 10 M, TECAN, 瑞士曼内多夫)测定 562 nm 处吸光度,带入标准曲线换算蛋白质量浓度。蛋白质提取率计算公式如下:

$$E = \frac{C_i \times V}{m} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

$E$ —蛋白质提取率,%(质量分数);

$C_i$ —提取液的蛋白质量浓度,mg/mL;

$V$ —提取液的体积,mL;

$m$ —脱脂虫粉的蛋白含量,mg。

### 1.4 蛋白质提取的响应面优化

基于单因素试验结果,利用 Design-Expert 10 软件内置的 Box-Behnken 响应面试验设计进行蛋白质提取工艺优化。

### 1.5 蛋白质等电点的测定

黑水虻幼虫蛋白质的等电点测定参考许彦

腾<sup>[23]</sup>的方法。将 4 mL 黑水虻幼虫蛋白质提取液用 1 mol/L 的 HCl 调至不同的 pH 值,将其置于 4 °C 下 4 h 待蛋白沉淀完全,于 2 841×g 的相对离心力下离心 10 min。将上清液完全转移定容,BCA 法测定溶液中蛋白质含量。蛋白质溶解率最小的 pH 即为等电点。

$$S = \frac{C_s}{C_e} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

$S$ —蛋白质溶解率,%(质量分数);

$C_s$ —上清液中的蛋白含量,mg;

$C_e$ —4 mL 黑水虻幼虫蛋白质提取液中的蛋白含量,mg。

### 1.6 黑水虻幼虫蛋白质的制备

分别采用超声波辅助碱法和传统热碱法提取黑水虻幼虫蛋白质。传统热碱法的提取条件参考许彦腾等<sup>[24]</sup>,具体如下,用 24.4 g/L 的 NaOH 溶液,以 22 mL/g 的液料比混合脱脂虫粉,在 53.2 °C 的温度下,100 r/min 搅拌提取 2 h。两种提取方法的提取液于 7 012×g 的相对离心力下离心 10 min,小心吸取上清液,重复上述步骤一次。将上清液于 pH 值 4 的等电点将蛋白沉淀后,于 3 944×g 的相对离心力下离心 6 min,去除上清液,保留沉淀。将沉淀用去离子水复溶,用 1 mol/L 的 NaOH 溶液调至中性后转移至预处理好的截留分子量为 7 000 Da 的透析袋中,4 °C 冰箱静置透析。按 12 h/次的频率换水 6 次。透析完成后置于 -80 °C 超低温冰箱中冷冻 4 h,然后置于冷冻干燥机(SCIENTZ-10N, 新芝生物科技股份有限公司,中国宁波)连续冻干 72 h,最终获得干燥的黑水虻幼虫蛋白质。

### 1.7 主要组成成分

测定了脱脂虫粉、超声辅助碱法以及传统热碱法提取得到的黑水虻粗蛋白样品中的水分、粗蛋白、粗脂肪、总糖、灰分、甲壳素的含量(质量分数)。测定方法参考《食品中水分的测定》(GB5009.3-2016)、《食品中蛋白质的测定》(GB5009.5-2016)、《食品中脂肪的测定》(GB5009.6-2016)、《肉制品 总糖含量测定》(GB/T9695.31-2008)、《食品中灰分的测定》(GB5009.4-2016)、《昆虫生理生化实验》(甲壳素的测定)<sup>[25]</sup>。

### 1.8 氨基酸分析

参考 Zozo 等<sup>[26]</sup>的方法测定样品的 9 种必须氨基酸含量。具体地,用 6 mol/L HCl 水解蛋白质后,采

用 PITC 柱前衍生化和高效液相色谱法测定样品中的水解氨基酸。由于色氨酸在酸水解条件下会被破坏,采用《饲料中色氨酸的测定》(GB/T 15400-2018),用 4 mol/L LiOH 水解后测定色氨酸含量。将样品的必需氨基酸含量转化为样品粗蛋白的必需氨基酸含量,然后与联合国粮食及农业组织 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 2013 年推荐的成人氨基酸评分模式<sup>[27]</sup>进行比较。

### 1.9 数据处理

所有试验均重复 3 次。结果表示为平均值 ± 标准差。常规数据处理软件为 Excel 2019; 显著性检验软件为 IBM SPSS Statistics 25,  $P < 0.05$  判定为有显著性差异, Tukey 检验用于进行多重比较; 响应面试验设计与统计分析软件为 Design-Expert 10; 利用 Origin 2018 软件进行图片绘制。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素试验

#### 2.1.1 超声波功率对蛋白质提取率的影响

选择不同的超声波功率, 在提取时间为 30 min, 液料比为 20 (mL/g), NaOH 质量浓度为 20 g/L 的基准条件下进行蛋白质提取, 结果如图 1a 所示。随着超声波的引入, 空化效应使黑水虻幼虫蛋白质提取率不断提高, 在 360 W 时获得最高提取率。但进一步提高超声波功率使得蛋白质提取率趋于降低, 这可能是高功率的超声波促进了蛋白质在碱性条件下的水解。因此, 选取 360 W 为最佳超声波功率, 在此条件下继续研究其他因素对提取率的影响。

#### 2.1.2 提取时间对蛋白质提取率的影响

如图 1b, 随着提取时间的延长, 蛋白质不断溶解在提取液中, 但是碱性条件下蛋白质不断水解, 当蛋白质的水解速率大于溶解速率时蛋白质提取率开始下降。结合显著性分析, 固定 60 min 为最佳提取时间。

#### 2.1.3 NaOH 质量浓度对蛋白质提取率的影响

如图 1c 所示, NaOH 质量浓度对黑水虻幼虫蛋白质的提取率影响很大, 从空白对照的 20% 附近快速上升到 70% 附近, 然后逐渐下降。说明适当的 NaOH 质量浓度能明显提高蛋白质提取率, 但过高的质量浓度会加剧蛋白质水解。因此选择 20 g/L 为最佳 NaOH 质量浓度。

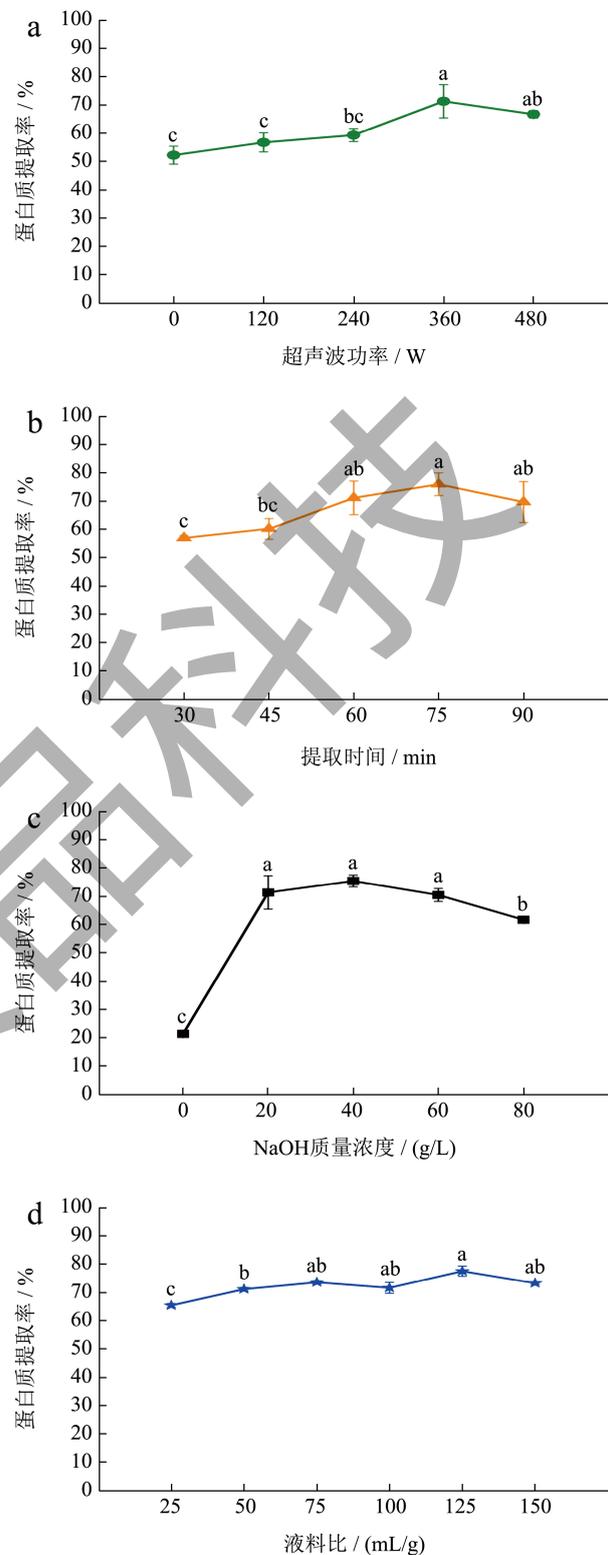


图 1 (a) 超声波功率、(b) 提取时间、(c) NaOH 质量浓度、(d) 液料比对黑水虻幼虫蛋白质提取率的影响

Fig.1 Effects of (a) ultrasonic power, (b) extraction time, (c) NaOH concentration, and (d) liquid-solid ratio on the protein extraction rate of black soldier fly larvae

注: 不同的字母 a~c 表示数据具有显著性差异,  $P < 0.05$ 。

### 2.1.4 液料比对蛋白质提取率的影响

如图 1d 所示, 提高液料比可以扩大提取液和物料的接触面积, 并降低溶解在提取液中的蛋白质浓度, 从而提高传质, 促进蛋白质溶解。因此, 随着液料比的提高, 提取率不断提高, 最后趋于平缓。故选取 50 (mL/g) 为最佳液料比。

## 2.2 超声辅助碱法提取黑水虻幼虫蛋白质的响应面优化

### 2.2.1 响应面试验建模及其方差分析

由于单因素试验结果均具有显著性差异, 因此将超声波功率、提取时间、NaOH 质量浓度、液料比这四个因子作为自变量。并以 Box-Behnken 试验设计方法对黑水虻幼虫蛋白质提取率进行优化。试验因素及水平的编码见表 1。其中, A、B、C、D 分别代表超声波功率、提取时间、NaOH 质量浓度、液料比。试验设计及试验结果见表 2, 其中含 24 个析因点, 5 次零点试验用于误差估计。利用 Design-Expert 10 对试验结果进行分析, 通过方差分析结果选择二次模型作为该 Box-Behnken 试验的优化模型。拟合的多元二次回归方程 (已编码) 为: 蛋白质提取率  $\gamma(\%)=77.15+0.040*A+0.14*B+29.20*C+2.14*D-0.52*AB-2.19*AC-1.50*AD+0.78*BC-1.64*BD+3.73*CD-4.84*A^2-0.99*B^2-31.99*C^2-3.32*D^2$ 。

表 1 响应面试验因素及水平编码表

Table 1 Factor levels coding table for response surface test

因素	编码	水平		
		-1	0	1
超声波功率/W	A	240	360	480
提取时间/min	B	45	60	75
NaOH 质量浓度/(g/L)	C	0	20	40
液料比 (mL/g)	D	25	50	75

模型的方差分析如表 3 所示。该模型  $P$  值小于 0.01, 模型极显著,  $R^2_{Pre}=0.9685$ 、 $R^2_{Adj}=0.9874$  趋于一致, 表明拟合方程预测与试验结果非常接近<sup>[28]</sup>。 $R^2=0.9937$ , 说明该模型可以解释 99.37% 的试验结果<sup>[29]</sup>。 $C.V.$  为变异系数, 反应模型的置信度, 该模型的  $C.V.=4.65\%$ , 变异系数越小说明模型重现性越好<sup>[30]</sup>。各因素对响应值影响大小为 NaOH 质量

浓度 > 液料比 > 提取时间 > 超声波功率。除该模型显著外, 一次项 C、D; 交互项 CD; 二次项  $A^2$ 、 $C^2$ 、 $D^2$  均有显著影响。其余一次项不显著的原因可能为水平选择范围过窄。

表 2 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and results

试验序号	A	B	C	D	蛋白质提取率/%
1	240	45	20	50	69.73
2	480	45	20	50	70.42
3	240	75	20	50	70.26
4	480	75	20	50	68.87
5	360	60	0	25	15.14
6	360	60	40	25	63.43
7	360	60	0	75	9.80
8	360	60	40	75	73.01
9	240	60	20	25	63.13
10	480	60	20	25	67.70
11	240	60	20	75	74.87
12	480	60	20	75	73.45
13	360	45	0	50	13.87
14	360	75	0	50	13.42
15	360	45	40	50	74.98
16	360	75	40	50	77.64
17	240	60	0	50	10.93
18	480	60	0	50	14.31
19	240	60	40	50	72.08
20	480	60	40	50	66.72
21	360	45	20	25	70.79
22	360	75	20	25	74.29
23	360	45	20	75	76.07
24	360	75	20	75	73.01
25	360	60	20	50	78.56
26	360	60	20	50	79.26
27	360	60	20	50	75.26
28	360	60	20	50	74.26
29	360	60	20	50	78.38

表 3 响应面二次模型的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	17 219.91	14	1 229.99	157.59	<0.000 1**
A- 超声波功率	0.019	1	0.019	0.002 49	0.960 9
B- 提取时间	0.22	1	0.22	0.029	0.867 9
C-NaOH 质量浓度	10 231.26	1	10 231.26	1 310.85	<0.000 1**
D- 液料比	55.16	1	55.16	7.07	0.018 7*
AB	1.08	1	1.08	0.14	0.715 3
AC	19.1	1	19.1	24.5	0.140 1
AD	8.96	1	8.96	1.15	0.302
BC	2.42	1	2.42	0.31	0.586 6
BD	10.74	1	10.74	1.38	0.260 3
CD	55.64	1	55.64	7.13	0.018 3*
A <sup>2</sup>	152.25	1	152.25	19.51	0.000 6**
B <sup>2</sup>	6.31	1	6.31	0.81	0.383 7
C <sup>2</sup>	6 636.9	1	6 636.9	850.34	<0.000 1**
D <sup>2</sup>	71.39	1	71.39	9.15	0.009 1**
残差	109.27	14	7.81		
失拟项	89.4	10	8.94	1.80	0.300 2
纯误差	19.87	4	4.97		
总误差	17 329.18	28			
R <sup>2</sup> =0.993 7	C.V.=4.65%				
R <sup>2</sup> <sub>Pre</sub> =0.968 5	R <sup>2</sup> <sub>Adj</sub> =0.987 4				

注: \* 表示具有显著性差异,  $P < 0.05$ ; \*\* 表示具有极显著性差异,  $P < 0.01$ 。

### 2.2.2 响应面分析

将二次模型方程其中两个因素处于“0”水平, 利用 Design-Expert 10 绘制另外两个因素的响应面和等高线图, 如图 2~7 所示。等高线圆圈上的每个点所对应两个因素的不同水平下, 响应值即蛋白质提取率都相同, 等高线越密集, 响应面则越陡峭, 响应值变化越快<sup>[24]</sup>。等高线的中心为最大响应值。等高线越接近圆, 说明这两个因素的交互作用对响应值影响越不显著; 等高线越椭圆, 越接近直线, 则表明这两个因素的交互作用对响应值影响越显著<sup>[24]</sup>。从图 2~7 可以看出, 随着两个因素水平的增加, 响应值都先增, 后趋于平缓, 最后加速下降, 都有最大值。另外, 提取时间和 NaOH 质量浓度 (图 5)、NaOH 质量浓度和液料比 (图 7) 的交互作用强于超声波功率和提取时间、超声波功率和 NaOH 质量浓度、超声波功率和液料比、提取时间和液料比的交互作用。而从表 3 的二次项显著性可知, NaOH

质量浓度和液料比的交互作用对蛋白提取率有显著影响, 其余交互作用没有显著影响。

### 2.2.3 最佳提取条件的预测与验证

由二次模型预测最佳提取条件为, 超声波功率 342 W, 时间 59.63 min, NaOH 质量浓度 24.5 g/L, 液料比 55.63 (mL/g), 在该条件下理论最大蛋白质提取率为 82.61%。结合实际生产, 微调后确定的最佳提取条件为, 超声波功率 342 W, 时间 60 min, NaOH 质量浓度 24.5 g/L, 液料比 56 (mL/g), 总体积 75 mL。三次平行实验的验证值为 80.37%±1.45%, 与理论预测值相比仅低 2.24%。这说明该响应面优化模型和最终确定的提取条件有效, 在实际生产中可行。将本方法与传统热碱法<sup>[24]</sup>进行比较。超声波辅助碱法提取在无需加热的同时缩短了一半的时间, 极大地提高了提取效率。超声波可以产生空化效应, 即溶剂的压力波动产生微小空泡, 当空泡爆炸时会破坏组织和细胞, 提高了传质, 进而提高提取效率<sup>[22]</sup>。

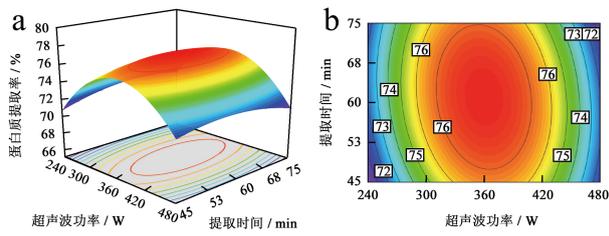


图2 超声波功率和提取时间对黑水虻幼虫蛋白质提取率影响的响应面 (a) 和等高线 (b)

Fig.2 Response surface (a) and contour (b) of ultrasonic power and extraction time on the protein extraction rate of black soldier fly larvae

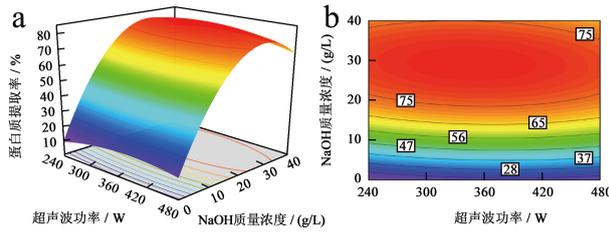


图3 超声波功率和 NaOH 质量浓度对黑水虻幼虫蛋白质提取率影响的响应面 (a) 和等高线 (b)

Fig.3 Response surface (a) and contour (b) of ultrasonic power and NaOH concentration on the protein extraction rate of black soldier fly larvae

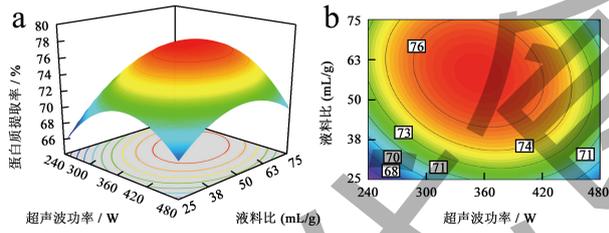


图4 超声波功率和液料比对黑水虻幼虫蛋白质提取率影响的响应面 (a) 和等高线 (b)

Fig.4 Response surface (a) and contour (b) of ultrasonic power and liquid-solid ratio on the protein extraction rate of black soldier fly larvae

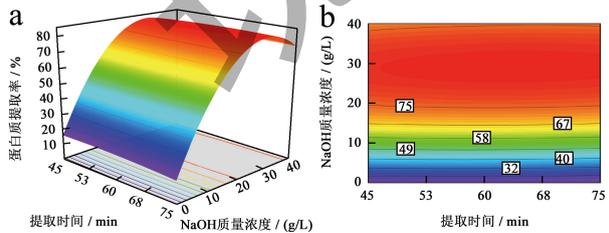


图5 提取时间和 NaOH 质量浓度对黑水虻幼虫蛋白质提取率影响的响应面 (a) 和等高线 (b)

Fig.5 Response surface (a) and contour (b) of extraction time and NaOH concentration on protein extraction rate of black soldier fly larvae

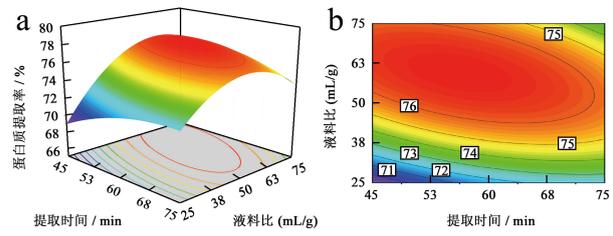


图6 提取时间和液料比对黑水虻幼虫蛋白质提取率影响的响应面 (a) 和等高线 (b)

Fig.6 Response surface (a) and contour (b) of extraction time and liquid-solid ratio on protein extraction rate of black soldier fly larvae

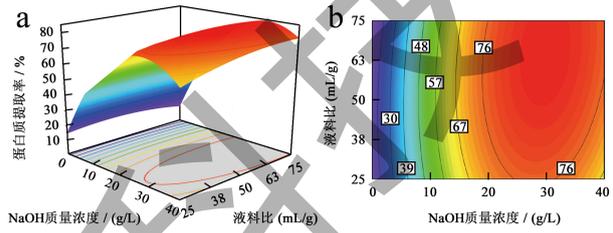


图7 NaOH 质量浓度和液料比对黑水虻幼虫蛋白质提取率影响的响应面 (a) 和等高线 (b)

Fig.7 Response surface (a) and contour (b) of NaOH concentration and liquid-solid ratio on the protein extraction black soldier fly larvae

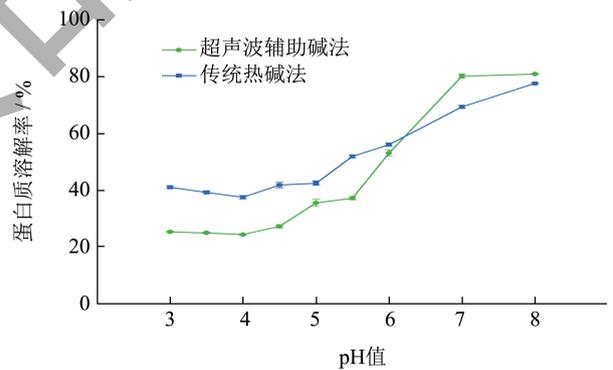


图8 超声波辅助碱法和传统热碱法提取得到的黑水虻幼虫蛋白质的溶解性

Fig.8 Solubility of black soldier fly larvae proteins obtained by ultrasound-assisted alkaline and conventional hot-alkali extractions

### 2.3 黑水虻幼虫蛋白质的等电点

当蛋白质处于等电点 ( $pI$ ) 时, 其净电荷为零, 此时溶解度最低, 通过测定蛋白在不同 pH 值下的溶解率可以估测蛋白质的等电点<sup>[31]</sup>。由图 8 可知, 两种提取方法得到蛋白质的等电点都为 4.0。因此, 蛋白质制备工艺中的沉淀条件为调整 pH 值至 4.0, 以沉淀尽可能多的蛋白质。这与 Miron 等<sup>[32]</sup>的研究

一致。然而，许彦腾<sup>[23]</sup>测得黑水虻幼虫蛋白质等电点为4.8，这可能是由于不同的生长龄期或前处理步骤导致样品的蛋白质组成不同。

### 2.4 主要组成成分

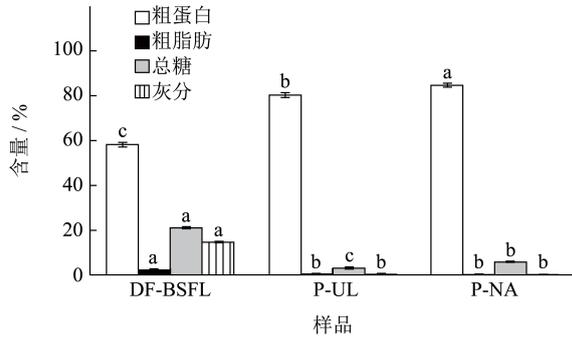


图9 不同样品的组成成分(干质量计)

Fig.9 Approximate compositions of different samples (dry weight basis)

注：DF-BSFL (Defatted Black Soldier Fly Larvae) 代表黑水虻幼虫脱脂粉；P-UL (Protein-ultrasound) 和 P-NA (Protein-NaOH) 分别代表超声波辅助碱法以及传统热碱法提取的黑水虻幼虫蛋白质样品。含量为质量分数。不同字母 a-c 表示不同样品的同一成分具有显著性差异， $P < 0.05$ 。

黑水虻幼虫脱脂粉以及两种提取方法得到黑水虻幼虫蛋白质样品的主要成分如图9所示。黑水虻幼虫脱脂粉的粗蛋白含量为58.76%。超声波辅助碱法提取将样品粗蛋白含量显著提高至80.75%，传统热碱法提取将样品粗蛋白含量显著

提高至84.55%。两种提取方案都显著降低了粗脂肪、总糖及灰分的含量。超声波辅助碱法提取的黑水虻幼虫蛋白质样品总糖含量(3.41%)要显著低于传统热碱法(6.21%)另外，在分离提取液和脱脂虫粉废料过程中，进行了两次离心。在第二次离心步骤中，可以再次获得一些沉淀。如果只离心一次就进行后续步骤，超声波辅助提取得到的蛋白样品含有3.64%的粗甲壳素，传统热碱法得到的蛋白样品含有1.54%的粗甲壳素。傅海舰<sup>[33]</sup>发现甲壳素经过超声波处理后可以获得更高的非衍生化水溶性甲壳素产量。因此，超声波辅助碱法提取可能导致更多甲壳素分散在提取液中，更不易被离心分离。

### 2.5 必需氨基酸含量

表4是本研究优化得到的超声波辅助碱法和传统热碱法<sup>[24]</sup>提取的黑水虻幼虫蛋白质(P-UL、P-NA)的必需氨基酸组成，以及与大豆蛋白、鸡蛋蛋白和FAO 2013的比较。样品P-UL和P-NA的各种必需氨基酸含量都大于FAO 2013年提出的成人氨基酸模式<sup>[27]</sup>。表明本研究得到的黑水虻幼虫蛋白质与鸡蛋蛋白<sup>[9]</sup>都能够满足成人的氨基酸需求，是高利用率的全价蛋白质。而大豆蛋白的亮氨酸和蛋氨酸含量低于FAO 2013年提出的成人氨基酸模式，说明它的氨基酸组成不平衡，不符合人体蛋白质所需。因此从氨基酸组成来看，黑水虻幼虫蛋白质要优于大豆蛋白，与鸡蛋蛋白相似。

表4 不同样品蛋白质的必需氨基酸组成以及与大豆蛋白、鸡蛋清蛋白以及FAO 2013成人氨基酸模式的比较

Table 4 Essential amino acid composition of different sample proteins and comparison with soy protein, egg white protein, and FAO 2013 adult amino acid patterns

必需氨基酸/(mg/g pro)	P-UL	P-NA	大豆蛋白 <sup>[34]</sup>	鸡蛋清蛋白 <sup>[9]</sup>	FAO 2013 <sup>[27]</sup>
组氨酸 Histidine	29.26 ± 0.34	30.86 ± 0.11	25	24	16
异亮氨酸 Isoleucine	51.71 ± 0.13	58.79 ± 0.27	49	56	30
亮氨酸 Leucine	81.87 ± 0.13	93.28 ± 0.23	56	83	61
赖氨酸 Lysine	71.15 ± 0.31	72.47 ± 0.09	56	74	48
蛋氨酸 Methionine	25.92 ± 0.09	32.43 ± 0.19	14	32	23
苯丙氨酸 Phenylalanine	57.85 ± 0.19	69.37 ± 0.20	55	51	41
苏氨酸 Threonine	36.58 ± 0.20	28.84 ± 0.15	39	51	25
色氨酸 Tryptophan	16.46 ± 0.02	18.24 ± 0.14	13	14	6.6
缬氨酸 Valine	67.08 ± 0.08	69.00 ± 0.20	51	76	40
总含量	437.87 ± 1.10	473.28 ± 1.18	358	461	290.6

注：P-UL 和 P-NA 分别代表超声波辅助碱法以及传统热碱法提取的黑水虻幼虫蛋白质。FAO 2013 代表联合国粮农组织于2013年提出的成人氨基酸模式。表中数据为平均值 ± 标准差。

### 3 结论

本研究将超声波辅助提取技术应用在黑水虻幼虫蛋白质的碱法提取中,并利用 Box-Behnken 响应面设计优化该工艺。首先进行了一系列单因素试验,包括超声波功率、提取时间、NaOH 质量浓度以及液料比。结果表明这四个因素对因变量均具有显著性影响。因此后续对四个因素进行响应面优化。优化得到的二次模型显著,软件预测出的最高提取率为 82.61%。结合实际生产,微调后确定的最佳提取条件为,超声波功率 342 W,时间 60 min,NaOH 质量浓度 24.5 g/L,液料比 56 (mL/g),总体积 75 mL。三次平行实验验证值为 80.37%,与理论预测值仅相差 2.24%。

超声波辅助碱法提取和传统热碱法得到的黑水虻幼虫蛋白质的等电点都为 4.0。本研究得到的黑水虻幼虫蛋白质样品的粗蛋白含量为 80.75%,传统热碱法样品蛋白含量为 84.55%。超声波辅助碱法和传统热碱法提取的黑水虻幼虫蛋白质的各种必需氨基酸含量都高于 FAO 在 2013 提出的成人氨基酸评分模式,说明其蛋白质的氨基酸比例协调,生物利用率较高。

本研究优化了一种超声波辅助碱法提取黑水虻幼虫蛋白质的方法。相对于传统热碱法,该方法在提取率、样品蛋白纯度和氨基酸组成上与传统热碱法相当,其优势是无需加热、提取时间更短。本研究的参数可以为昆虫蛋白的提取开发提供理论支持,促进昆虫蛋白在食品、保健品、饲料等领域的应用。

### 参考文献

- [1] ABEL G J, BARAKAT B, KC S, et al. Meeting the sustainable development goals leads to lower world population growth [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, 113(50): 14294-14299.
- [2] MÜLLER A, WOLF D, GUTZEIT H O. The black soldier fly, *Hermetia illucens*-a promising source for sustainable production of proteins, lipids and bioactive substances [J]. Zeitschrift für Naturforschung C, 2017, 72(9-10): 351-363.
- [3] VAN HUIS A. Potential of insects as food and feed in assuring food security [J]. Annu Rev Entomol, 2013, 58: 563-583.
- [4] VILLASEÑOR V M, ENRIQUEZ-VARA J N, URÍAS-SILVA J E, et al. Edible insects: Techno-functional properties food and feed applications and biological potential [J]. Food Reviews International, 2022, 38: 866-892.
- [5] MINTAH B K, HE R, AGYEKUM A A, et al. Edible insect protein for food applications: Extraction, composition, and functional properties [J]. Journal of Food Process Engineering, 2020, 43(4): 13362.
- [6] FUSO A, BARBI S, MACAVEI L I, et al. Effect of the rearing substrate on total protein and amino acid composition in Black Soldier Fly [J]. Foods, 2021, 10(8): 1773.
- [7] CALIGIANI A, MARSEGLIA A, LENI G, et al. Composition of black soldier fly prepupae and systematic approaches for extraction and fractionation of proteins, lipids and chitin [J]. Food Research International, 2018, 105: 812-820.
- [8] LENI G, CALIGIANI A, SFORZA S. Killing method affects the browning and the quality of the protein fraction of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) prepupae: a metabolomics and proteomic insight [J]. Food Research International, 2019, 115: 116-125.
- [9] MSHAYISA V V, Van WYK J, ZOZO B. Nutritional, techno-functional and structural properties of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae flours and protein concentrates [J]. Foods, 2022, 11(5): 724.
- [10] YOUNG V R, PELLETT P L. Protein evaluation, amino acid scoring and the Food and Drug Administration's proposed food labeling regulations [J]. The Journal of Nutrition, 1991, 121(1): 145-150.
- [11] LENI G, TEDESCHI T, FACCINI A, et al. Shotgun proteomics, in-silico evaluation and immunoblotting assays for allergenicity assessment of lesser mealworm, black soldier fly and their protein hydrolysates [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 1228.
- [12] HIGA J E, RUBY M B, ROZIN P. Americans' acceptance of black soldier fly larvae as food for themselves, their dogs, and farmed animals [J]. Food Quality and Preference, 2021, 90: 104119.
- [13] CASTRO M, CHAMBERS E. Consumer avoidance of insect containing foods: Primary emotions, perceptions and sensory characteristics driving consumers considerations [J]. Foods, 2019, 8(8): 351.
- [14] BALZAN S, FASOLATO L, MANIERO S, et al. Edible insects and young adults in a north-east Italian city an exploratory study [J]. British Food Journal, 2016, 118(2): 318-326.
- [15] LALANDER C, DIENER S, MAGRI M E, et al. Faecal sludge management with the larvae of the black soldier fly (*Hermetia illucens*)-From a hygiene aspect [J]. Science of The Total Environment, 2013, 458-460: 312-318.
- [16] BESSA L W, PIETERSE E, MARAIS J, et al. Food safety of consuming Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) larvae: Microbial, heavy metal and Cross-Reactive Allergen Risks [J]. Foods, 2021, 10(8): 1934.
- [17] 赵国玉,曹莉,陈镜华,等.昆虫蛋白的价值、应用及提取

- 工艺[J].环境昆虫学报,2015,37(4):894-904.
- [18] 孙雁,任发政,范金波,等.碱法制备蚕蛹蛋白浸提条件的优化[J].农业工程学报,2009,25(2):285-289.
- [19] ZHENG S, ZHANG G, WANG H, et al. Progress in ultrasound-assisted extraction of the value-added products from microorganisms [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2021, 37(4): 71.
- [20] SUN X, ZHANG W, ZHANG L, et al. Effect of ultrasound-assisted extraction on the structure and emulsifying properties of peanut protein isolate [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(3): 1150-1160.
- [21] PICÓ Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2013, 43: 84-99.
- [22] KING WASCHARAPONG P, CHAIJAN M, KARNJANAPRATUM S. Ultrasound-assisted extraction of protein from Bombay locusts and its impact on functional and antioxidative properties [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 17320.
- [23] 许彦腾.黑水虻幼虫蛋白质提取与抗氧化活性及理化特性研究[D].咸阳:西北农林科技大学,2015.
- [24] 许彦腾,张建新,宋真真,等.响应面法优化黑水虻幼虫蛋白质提取工艺[J].昆虫学报,2014,57(4):401-410.
- [25] 南京农业大学.昆虫生理生化实验[M].北京:农业出版社,1993.
- [26] ZOZO B, WICHT M M, MSHAYISA V V, et al. Characterisation of black soldier fly larva protein before and after conjugation by the Maillard reaction [J]. Journal of Insects as Food and Feed, 2022, 8(2): 169-183.
- [27] Food and Agriculture Organization and World Health Organization (FAO/WHO). Dietary protein quality evaluation in human nutrition. Report of an FAQ Expert Consultation [M]. Rome, 2013.
- [28] WANG Y, GUO L, ZHANG J, et al. Optimization of operating conditions for the acidification metabolites production with waste sludge using response surface methodology (RSM) [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2019, 26(29): 30303-30312.
- [29] JALALUDIN N, RAHMAN R A, RAZALI F, et al. Optimization of fresh palm oil mill effluent biodegradation with *Aspergillus niger* and *Trichoderma virens* [J]. Archives of Environmental Protection, 2016, 42(1): 63-73.
- [30] ZHU J, FU Q. Optimization of ultrasound-assisted extraction process of perilla seed meal proteins [J]. Food Science and Biotechnology, 2012, 21(6): 1701-1706.
- [31] 李佳钊,李亚隆,高柳,等.黑米蛋白的提取工艺优化及其功能性质研究[J].食品科技,2019,44(4):236-243.
- [32] MIRON L, MONTEVECCHI G, BRUGGEMAN G, et al. Functional properties and essential amino acid composition of proteins extracted from black soldier fly larvae reared on canteen leftovers [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2023, 87: 103407.
- [33] 傅海舰.非衍生化水溶性甲壳素的制备及其生物活性研究[D].青岛:中国海洋大学,2004.
- [34] JUE L, MARIANNE K, MONIQUE V, et al. Amino acid availability of a dairy and vegetable protein blend compared to single casein, whey, soy, and pea proteins: A Double-Blind, Cross-Over Trial [J]. Nutrients, 2019, 11(11): 2613.