

# 酶解啤酒废酵母 生产橘小实蝇蛋白饵剂的研究

王波, 黄居昌\*, 季清娥, 杨建全, 陈家骅

(福建农林大学 益虫研究所, 福建 福州 350002)

**摘要:** 水解蛋白液是橘小实蝇蛋白饵剂的核心组成成分, 研究利用酶解法从啤酒废酵母中提取水解蛋白的加工工艺。通过正交试验, 对水解温度、pH、时间和加酶量 4 个水解影响因素进行分析, 结果显示, 最佳工艺条件为 pH 值 6.0, 温度 50 ℃, 时间 18 h, 加酶量为 2.0 mg/mL。室内生物测定的结果表明, 水解蛋白液对橘小实蝇的引诱率可达 60.00%, 其中雌性和雄性的引诱率分别为 63.30% 和 56.70%。总糖与蛋白质含量的比例是影响引诱率的重要因素, 当二者之比为 200:1 时, 引诱率最高。

**关键词:** 橘小实蝇; 蛋白饵剂; 啤酒废酵母; 水解蛋白; 引诱率

中图分类号: Q969.456.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-2286(2010)02-0299-04

## A Study on the Production of Protein Bait for *Bactrocera dorsalis* (Hendel)

WANG Bo, HUANG Ju-chang\*, JI Qing-e, YANG Jian-quan, CHEN Jia-hua

(Institute of Beneficial Insect, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** Hydrolysate protein was the important component of protein bait for *Bactrocera dorsalis* (Hendel). The processing technology of extracting hydrolysate protein from waste beer yeast by using the enzymolysis method was studied. Through the orthogonal test, the temperature of hydrolysis, pH, amount of time and enzyme were analyzed, the results showed that the optimum conditions were the value of pH 6.0, temperature 50 ℃, time 18 h, the amount of enzyme 2.0 mg/mL respectively. The laboratory bioassay of hydrolysate protein for *B. dorsalis* was studied, the results showed that the rate of attractant was 60.00%, attractant rate to females and males were 63.30% and 56.70% respectively. The ration of total sugar to protein content is an important factor which affects the attractant effectiveness, when the ratio was 200:1, the attractant rate of the lure was the highest.

**Key words:** *Bactrocera dorsalis*; protein bait; waste beer yeast; hydrolysate protein; attractant rate

利用昆虫在生长发育过程中必须取食蛋白的特点, 国外早在 20 世纪 50 年代就开始利用蛋白饵剂来防控实蝇类害虫<sup>[1]</sup>, 国外最初是从大豆、玉米中获得水解蛋白, 一般采取酸碱法, 但其缺点主要有两个方面, 一是原材料价格高; 二是产物中含有较高的盐, 实蝇不好取食<sup>[2-4]</sup>。后来逐渐使用啤酒废酵母获得水解蛋白<sup>[5]</sup>。国内利用水解蛋白防治实蝇的研究还处于初步阶段<sup>[6]</sup>, 但从啤酒废酵母中提取蛋白

收稿日期: 2009-12-11 修回日期: 2010-03-12

基金项目: 福建省重大科技资助项目 (2006NZ002) 和农业部“948”项目 (2009Z40)

作者简介: 王波 (1982-), 男, 博士生, 主要从事害虫生物防治研究, E-mail: wangbofjz@163.com; \*通讯作者: 黄居昌, 副研究员, 主要从事害虫田间综合防治的研究, E-mail: jchuang52@126.com.

或其它营养成分的工艺研究较多,方法也由自溶法发展到更加高效和温和的酶解法<sup>[7-10]</sup>。

废啤酒酵母是啤酒工业的副产物,含有丰富的蛋白质、核酸、维生素和矿物质,其中蛋白质含量在 50%左右,在食品工业、医药工业和饲料工业中有广泛应用<sup>[11]</sup>。中国是啤酒生产大国,现有啤酒企业 500 多家,年产啤酒 3000 多万 t,每年产啤酒废酵母 60~90 万 t,如果不对其进行综合利用,势必造成资源的浪费和环境的严重污染<sup>[12]</sup>。

蛋白诱剂目前已成为防控实蝇类害虫的重要措施,它不仅对雌雄都有诱杀作用,而且具有环境友好、对人和其它有益昆虫无毒等优点。本研究采用酶解法从啤酒废酵母中提取水解蛋白,优化生产工艺,这不仅降低了生产成本,而且可解决啤酒工业废物的利用问题,最终降低产品价格,增加农作物的生产效益。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料及试剂

供试虫源:供试橘小实蝇成虫由室内连续饲养获得,饲养温度控制在(25±1),相对湿度为(75±5)%,光周期为 D:L=12:12。啤酒废酵母(惠泉啤酒有限公司);木瓜蛋白酶(广西庞博生物有限公司);(乙醇)=95%;(磷酸)=85%;考马斯亮蓝 G-250 试剂;牛血清标准蛋白;柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 4.0, pH 8.0);3,5-二硝酸水杨酸等。

### 1.2 仪器及设备

752N 紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);SHZ-82A 恒温振荡器(常州国华仪器有限公司);DK-S24 电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);PHS-3B 精密酸度计(上海虹益仪器仪表有限公司)。

### 1.3 方 法

1.3.1 啤酒废酵母的前处理 取 1 000 mL 啤酒废酵母,90℃下加热 12 h,120 r/min 搅拌,4℃保存备用。

1.3.2 酶解工艺条件的选择 根据预备试验结果,选取酶解温度、pH 值、加酶量和时间 4 个影响因素,设计为 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验(表 1)。

表 1 正交实验因素水平

Tab 1 The level of the orthogonal experimental factors

水平 Level	因素 Factor			
	A 温度 / Temperature	B pH 值 Value of pH	C 加酶量 /mg·mL <sup>-1</sup> Amount of adding papain	D 时间 /h Time
1	45	6.0	1	18
2	50	6.5	2	24
3	55	7.0	3	36

1.3.3 室内生物测定 室内饲养条件下,每笼接入 40 只橘小实蝇成虫,雌雄各 20 只,于 07:00-08:30 进行,测试前 10 min 拿走饲料和水。在 2 个自制诱瓶中分别加入 2 mL 水解蛋白和水(对照),放入养虫笼的对角线位置,测试时间为 30 min,统计 2 个诱瓶中实蝇的数量,并记录雌雄的数量。每个处理 3 个重复。

$$\text{引诱率} = (\text{蛋白诱剂的引诱数量} - \text{对照引诱数量}) / 20 \times 100\% \quad (1)$$

1.3.4 酶解产物中蛋白质和糖含量的测定 蛋白质含量测定——参考 Bradford 的考马斯亮蓝法<sup>[13]</sup>;总糖含量的测定——参考 3,5-二硝酸水杨酸法<sup>[14]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 正交实验方案及生物测定结果

直观分析(表 2)中,极值 R<sub>B</sub> > R<sub>D</sub> > R<sub>A</sub> > R<sub>C</sub>,即各因素重要性依次为 B(pH)大于 D(水解时间)大于 A(温度)大于 C(酶量),结果表明:最佳的提取条件是 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>,即温度 50℃,pH 值 6.0,加酶量为 2 mg/mL,时间 18 h。

表 2 正交实验的实验方案及结果

Tab 2 The plan and results of the orthogonal experiment

实验号 No. of experiment	A	B	C	D	引诱率 Attritant rate
1	1 (45)	1 (6.0)	1 (1)	1 (18)	0.525
2	1 (45)	2 (6.5)	2 (2)	2 (24)	0.425
3	1 (45)	3 (7.0)	3 (3)	3 (36)	0.288
4	2 (50)	1 (6.0)	2 (2)	3 (36)	0.600
5	2 (50)	2 (6.5)	3 (3)	1 (18)	0.467
6	2 (50)	3 (7.0)	1 (1)	2 (24)	0.333
7	3 (55)	1 (6.0)	3 (3)	2 (24)	0.545
8	3 (55)	2 (6.5)	1 (1)	3 (36)	0.343
9	3 (55)	3 (7.0)	2 (2)	1 (18)	0.377
$K_1$	1.238	1.670	1.201	1.369	$T = 15.612$
$K_2$	1.400	1.235	1.402	1.303	
$K_3$	1.265	0.998	1.300	1.231	
$k_1$	0.413	0.557	0.400	0.456	
$k_2$	0.467	0.400	0.456	0.434	
$k_3$	0.422	0.467	0.434	0.410	
极差 R Range	0.054	0.157	0.056	0.046	
优水平 Optimal level	$A_2$	$B_1$	$C_2$	$D_1$	
优组合 Optimal composition	$A_2 B_1 C_2 D_1$				

A—温度, B—pH, C—加酶量, D—时间。

A - Temperature, B - pH, C - Amount of adding papain, D - Time

2.2 水解蛋白液中蛋白质和糖含量的测定结果

图 1, 图 2 分别为牛血清蛋白和葡萄糖的标准曲线, 二者的  $R^2$  分别是 0.990 2 和 0.999 8, 符合测定标准, 由此得到的回归方程分别为  $y = 0.1028x - 0.1309$  和  $y = 0.1842x - 0.0088$ , 可直接用于待测样品的测试和计算。

结果 (表 3) 表明, 总糖与蛋白质含量之比为 200:1 时, 平均引诱率最大可达 60.00%, 其中雌性和雄性的引诱率分别为 63.30% 和 56.70%。当二者比例小于 200 时, 引诱率随着比例的增大而增加, 当二者比例大于 200 时, 引诱率明显下降, 最低仅为 28.80%。此外, 由于雌虫羽化后更需补充营养完成生殖发育、交配和产卵, 水解蛋白液对雌虫的引诱率明显高于雄虫。

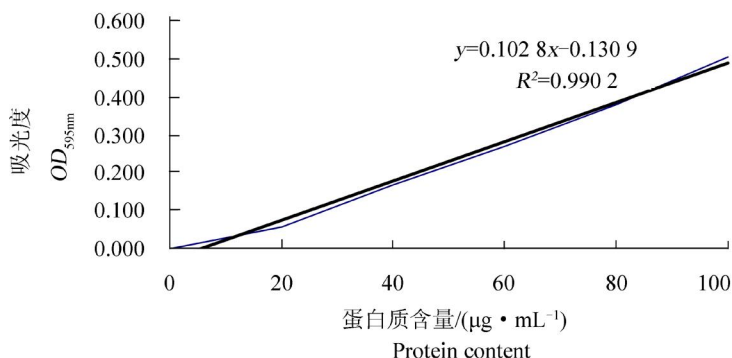


图 1 考马斯亮蓝标准曲线

Fig 1 The standard curve of coomassie brilliant blue

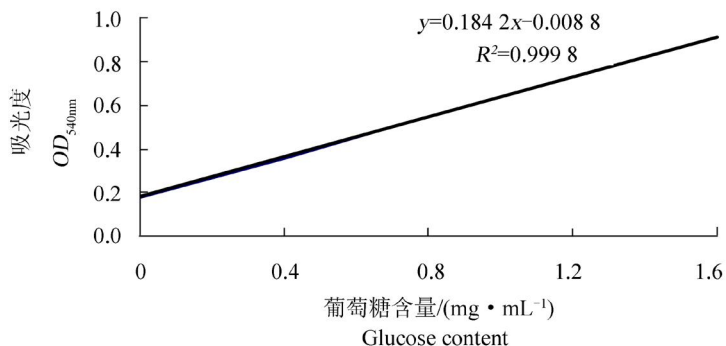


图 2 3, 5 - 二硝酸水杨酸法制作葡萄糖标准曲线

Fig 2 The standard curve of glucose by use 3, 5 - 2 nitric acid methods

表 3 水解蛋白液中蛋白质和总糖含量与引诱率之间的关系

Tab 3 The relationship between the content of protein and total sugar in hydrolyzed protein liquid and the attractant rate of *B. dorsalis* /%

实验号 No. of experiment	蛋白质含量 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) Protein	总糖含量 / ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) Total sugar	总糖 蛋白质 Total sugar protein	引诱率 Attractant rate	
				雌性 Female	雄性 Male
1	60.11	11.24	187.1	56.30	48.70
2	25.66	4.68	182.1	51.70	33.30
3	18.69	5.15	276.1	35.30	22.30
4	50.22	10.05	200.1	63.30	56.70
5	36.52	8.12	222.1	52.70	40.70
6	12.61	4.49	356.1	40.30	26.30
7	35.71	7.03	197.1	58.30	50.70
8	9.13	2.62	287.1	48.30	20.30
9	15.53	5.59	360.1	41.70	33.70

### 3 讨 论

研究发现,虽然蛋白饵剂的引诱效果与其中的小肽、氨基酸和代谢产生的胺类物质有关,但水解蛋白的引诱活性与蛋白质的含量之间没有明显的规律,总糖含量也是一个重要影响因素,因为实蝇不仅需要取食蛋白质完成进一步发育,同时需要能量来完成飞行、觅食、交配等行为,二者的比例共同决定了蛋白饵剂的挥发性风味物质,此结果对研究蛋白饵剂的引诱机理有一定的指导作用。

对于蛋白饵剂引诱机理的研究主要涉及到两个方面,一是明确蛋白饵剂中有效成分,即蛋白质和糖的比例、蛋白质中氨基酸、小肽的组成、总糖中单糖和多糖的组成等;二是通过固相微萃取结合气质联用仪(SPME-GC-MS)测定蛋白饵剂的挥发性物质,并结合触角电位仪测试其对橘小实蝇的引诱活性。合适的比例和组成直接决定其挥发性物质,进而影响引诱效果。

啤酒废酵母泥中存在大量的谷物、皮壳碎末、酒花树脂、死酵母细胞壁等杂质,为了增加产品的适口性和风味,必须在预处理中将其除去。此外,啤酒废酵母前处理的温度和时间有待于进一步优化,其中包括两个方面,一是酵母细胞壁的破壁,可使用超声波破壁或加入一定量的促溶剂后效果更佳;二是要在此研究结果的基础上,进一步缩小各因素的水平值,以获得更佳的酶解条件。

#### 参考文献:

- [1] Stenier L F. Fruit fly control in Hawaii with poison bait sprays containing protein hydrolysates[J]. J Econ Entomol, 1952, 45(6): 838 - 843.
- [2] Gunther F A, Binn R C, Barnes M M, et al. Dimethyl sulfide as a volatile constituent of a com protein hydrolysate attractive to fruit flies[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1967, 2(2): 121 - 125.
- [3] Epsky N D, Heath R B, Holler T C, et al. Com steepwater as protein bait for *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) [J]. Entomological Society of America, 1994, 23(4): 827 - 831.
- [4] Bharathi T E, Sathiyandam V K R, David P M M. Attractiveness of some food baits to the melon fruit fly, *Bactrocera cucumbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) [J]. International Journal of Tropical Insect Science, 2004, 24(2): 125 - 134.
- [5] Lloyd A, Drew R A. I Modification and testing of brewery waste yeast as a protein source for fruit fly bait[M] // Alwood A J, Drew R A. I Fruit fly management in the Pacific ACAR Proceedings, 1997.
- [6] 杜迎刚, 陈家骅, 李清娥, 等. 一种新型蛋白诱剂对橘小实蝇引诱作用 [J]. 福建林学院学报, 2007, 27(3): 259 - 262.
- [7] 贾冬舒. 利用生物技术从啤酒废酵母泥中提取生物蛋白质的研究 [J]. 浙江工业大学学报, 2003, 31(2): 212 - 215.
- [8] 汤务霞. 啤酒废酵母自溶条件的研究 [J]. 食品工业, 2006(5): 28 - 30.
- [9] 刘蓉, 邓泽元, 李瑞贞. 啤酒废酵母中蛋白质提取工艺的研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(10): 168 - 170.
- [10] 张俊杰. 啤酒废酵母中蛋白质的提取 [J]. 河北理工大学学报: 自然科学版, 2008, 30(1): 92 - 95.
- [11] 李成伟, 王莉, 周庆峰. 啤酒废酵母综合利用的研究进展 [J]. 商丘师范学院学报, 2007, 23(9): 96 - 98.
- [12] 孙伟峰, 周素梅, 王强. 废啤酒酵母综合利用研究进展 [J]. 化工进展, 2008, 27(7): 990 - 994, 1000.
- [13] 白玲, 黄健. 基础生物化学实验 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 2004: 87 - 88.
- [14] 丛峰松. 生物化学实验 [M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2005: 91 - 93.