

蚕蛹油和蚕蛹蛋白组成及潜在过敏原分布研究

谢盛莉¹, 张宇昊^{1,2}, 马良^{1,2}, 侯勇², 戴宏杰¹, 周鸿媛¹,
郭婷¹, 余永¹

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715; 2. 西南大学前沿交叉学科研究院, 生物学研究中心, 重庆 400715)

摘要: 为了进一步加强蚕蛹的综合利用, 以鲜蚕蛹为原料, 对蚕蛹油中脂肪酸组成和不同溶解特性蛋白的等电点、相对含量和亚基组成进行研究, 并进一步分析了潜在过敏原在不同蛋白中的分布。结果表明: 蚕蛹油中不饱和脂肪酸相对含量为 60.83%, 其中油酸相对含量最高, 为 35.43%。鲜蚕蛹蛋白中不溶性蛋白相对含量最高, 为 53.00%, 亚基分布在 27~85 kDa 之间; 水溶性蛋白占 23.63%, 等电点为 3.8, 亚基分布在 25~85 kDa 之间; 碱溶性蛋白占 19.73%, 等电点为 4.4, 亚基分布在 13~29 kDa 之间; 盐溶性蛋白占 2.58%, 等电点为 2.0, 亚基分布在 15~35 kDa 之间; 醇溶性蛋白仅占 1.06%, 等电点为 4.2, 亚基分布在 12 kDa 和 20 kDa 附近。过敏原分布研究表明: 水溶性、醇溶性、盐溶性、碱溶性蛋白和不溶性蛋白中分别检出 6、8、8、12 种和 3 种过敏原, 其相对含量分别为 1.33%、25.64%、1.21%、17.93% 和 9.86%。过敏原含量较多的蛋白须经过相关脱敏处理方可应用于食品工业。

关键词: 蚕蛹; 蚕蛹油; 蚕蛹蛋白; 过敏原

中图分类号: TS225.2; TS201.2 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2020)01-0031-07

Compositions of silkworm pupa oil and protein and potential allergen distribution

XIE Shengli¹, ZHANG Yuhao^{1,2}, MA Liang^{1,2}, HOU Yong², DAI Hongjie¹,
ZHOU Hongyuan¹, GUO Ting¹, YU Yong¹

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Biological Science Research Center, Academy for Advanced Interdisciplinary Studies, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: To further strengthen the comprehensive utilization of silkworm pupa, using fresh silkworm pupa as raw material, the fatty acid composition of silkworm pupa oil and the isoelectric point, relative content and subunit composition of silkworm pupa proteins with different solubility characteristics were studied. Furthermore, the potential allergen distributions in different proteins were also analyzed. The results showed that the relative content of unsaturated fatty acids in silkworm pupa oil was 60.83%, in which the content of oleic acid was the highest (35.43%). The relative content of insoluble protein in silkworm pupa protein was the highest (53.00%), showing a subunit distribution in 27-85 kDa; the water-soluble protein accounted for 23.63% and the isoelectric point was 3.8, showing a subunit distribution in 25-85 kDa; the alkali-soluble protein accounted for 19.73% and the isoelectric point was 4.4, showing

a subunit distribution in 13-29 kDa; the salt-soluble protein accounted for 2.58% and the isoelectric point was 2.0, showing a subunit distribution in 15-35 kDa; the alcohol-soluble protein only accounted for 1.06% and the isoelectric point was 4.2, showing subunits distribution mainly in about 12 kDa and 20 kDa. Allergen distribution studies showed that the water-soluble, alcohol-soluble, salt-soluble, alkali-sol-

收稿日期: 2019-05-06; 修回日期: 2019-09-24

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2016YFD0400200); 国家自然科学基金面上项目(31671881); 重庆市基础科学与前沿技术研究项目(cstc2018jcyjA0939); 中央高校基本科研业务费重点项目(XDJK2019B028)

作者简介: 谢盛莉(1994), 女, 硕士, 研究方向为食品化学与营养(E-mail) xsl33@163.com。

通信作者: 张宇昊, 教授(E-mail) zhy1203@163.com。

uble and insoluble protein contained six, eight, eight, twelve and three kinds of allergens respectively, and their relative contents were 1.33%, 25.64%, 1.21%, 17.93% and 9.86% respectively. Proteins with high levels of allergens must be desensitized before being used in the food industry.

Key words: silkworm pupa; silkworm pupa oil; silkworm pupa protein; allergen

蚕蛹是蚕蛾科家蚕蛾的蛹,属于蚕茧抽丝后的副产物。我国的蚕蛹年产量超过 30 万 t,约占世界总产量的 80%^[1]。作为一种富含营养物质的食源性昆虫,蚕蛹于 1998 年被卫生部批准为“可作为普通食品管理的新资源食品”,是第一个被认定的昆虫类食品。但长期以来蚕蛹利用率较低,资源浪费较多。

在新型蚕蛹食品开发方面,重点是脂肪和蛋白的利用。蚕蛹油中含有多种对人体有益的不饱和脂肪酸。蔡沙等^[2]采用气相色谱法测定了精炼蚕蛹油的脂肪酸组成,不饱和脂肪酸含量占 75.40%;张研宇等^[3]利用气相色谱对正己烷提取的蚕蛹油中不饱和脂肪酸含量进行了测定,其含量占 72.8%。

蚕蛹中蛋白质含量十分丰富,其研究主要集中在基于一级结构的营养性评价及活性多肽制备等方面。吕汶骏等^[4]研究表明蚕蛹蛋白中 8 种必需氨基酸占比达到 49.09%,高于 FAO/WHO 建议必需氨基酸占比 40%。活性肽的制备及其构效研究是目前蚕蛹蛋白研究的热点。Jia 等^[5]成功纯化出一种新的三肽 Lys - His - Val,其 ACE 抑制活性较强,IC₅₀ 值为 12.82 μmol/L,并且对胃肠道蛋白酶稳定。蚕蛹蛋白同样具备良好的功能特性。练钊等^[6]采用 Osborn 法提取缂丝后蚕蛹中的水溶性、盐溶性、醇溶性蛋白和碱溶性蛋白,并对这 4 种蛋白的含量及相关功能进行了研究。结果表明:蚕蛹中水溶性蛋白的氮溶解指数为 97.19%,具有良好的溶解性;醇溶性蛋白具有很好的乳化性,乳化活性达到 46.38 m²/g;盐溶性蛋白具有良好的保油性。由此可见,蚕蛹蛋白按照溶解性分级后,可依据其功能特性被广泛应用于不同食品加工领域。

目前食品领域内未见到成熟且商业化的蚕蛹相关产品,主要瓶颈在于蚕蛹具有致敏性,部分人食用蚕蛹后会出现头晕、恶心、呕吐等不良反应,甚至会出现直接休克的严重致敏反应。因此,要充分开发和利用蚕蛹蛋白资源,同时考虑到食品安全性,必须解决蚕蛹致敏问题。研究表明蚕蛹蛋白的过敏原主要包括卵黄原蛋白^[7-8]、热休克蛋白^[7-9]、胰凝乳蛋白酶抑制剂^[7-9]、丙糖磷酸盐异构酶^[7-9]、30K 家

族蛋白^[7-11]、硫醇过氧化还原酶^[12]、化学感受蛋白^[12]、几丁质酶^[13-14]、表皮蛋白^[15-16]、LOC 蛋白^[17]、副肌球蛋白^[14]和 27 kDa 血淋巴糖蛋白^[18]等。但对于过敏原在蚕蛹蛋白中的分布规律未见报道,严重限制了蚕蛹蛋白在食品工业中的广泛应用。

本研究在蚕蛹基本成分分析的基础上,采用气相色谱-质谱法测定了蚕蛹油的脂肪酸组成,重点分析了蚕蛹蛋白的成分,并系统研究了蚕蛹蛋白中潜在过敏原分布,以期蚕蛹在食品工业中的开发与利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

鲜蚕蛹:家蚕实验品种“夏芳”(家蚕基因组生物学国家重点实验室提供),25℃、桑叶饲养,化蛹后第 3 天放置于 -20℃ 冻存备用。

石油醚、硫酸、盐酸、硼酸、硫酸铜、硫酸钾、氢氧化钠、甲基红、溴甲酚绿、亚甲基蓝、乙酸镁、酒石酸钠钾、亚铁氰化钾、乙酸锌、葡萄糖、无水乙醇(99.9%)、氯化钠、十二烷基硫酸钠、过硫酸铵、甲醇、冰乙酸、三羟甲基氨基甲烷、无水硫酸钠、尿素、碘乙酰胺、三氟乙酸、四甲基乙二胺、30% 丙烯酰胺、1.5 mol/L Tris - HCl、1.0 mol/L Tris - HCl、二硫苏糖醇(DTT)、4 × loading buffer(非还原)、2 × loading buffer(非还原)、考马斯亮蓝 R - 250、甘氨酸、蛋白质 Marker(10 ~ 200 kDa)等均为市售分析纯,正己烷、甲酸为色谱纯,胰蛋白酶(酶活性 ≥ 4 500 U/mg,测序级,重庆鼎国生物技术有限责任公司),实验用水均为二次蒸馏水。

1.1.2 仪器与设备

DGG - 9140A 电热恒温鼓风干燥箱,JA3003B 电子天平,九阳料理机,JHH - 6 数显恒温水浴锅,DW - 3 数显电动搅拌器,KQ3200DV 数控超声波清洗器,Heraeus Multifuge X3R 高速冷冻离心机,PHS - 25 数显酸度计,Power PacTM 基础电泳仪,K5800C 超微量紫外分光光度计,RE52CS - 1 旋转蒸发仪,FD - 1A - 50 冷冻干燥机,SHZ - D(Ⅲ)循环水式真空泵,GC - 2010 气相色谱质谱联用仪,Q - Exactive 液相色谱质谱联用仪。

1.2 实验方法

1.2.1 鲜蚕蛹主要成分测定

参照 GB 5009.3—2016 中第一法,直接干燥法测定水分含量;参照 GB 5009.6—2016 中第一法,索氏抽提法测定脂肪含量;参照 GB 5009.5—2016 中第一法,凯氏定氮法测定蛋白质含量;参照 GB 5009.4—2016 第一法,测定灰分含量;参照 GB/T 9695.31—2008 中第二法,测定总糖含量。

1.2.2 蚕蛹预处理

将解冻的鲜蚕蛹用水清洗并除去杂质,然后在 60℃ 恒温鼓风干燥箱中干燥 24 h,干蚕蛹用九阳料理机粉碎后备用。

1.2.3 蚕蛹油提取

将粉碎的蚕蛹经石油醚索氏提取蚕蛹油。提取条件为料液比 1:20、提取温度 50℃、提取时间 8 h,采用旋蒸除去石油醚,得到蚕蛹油。

1.2.4 蚕蛹蛋白提取

参照 Osborn 方法^[19]将脱脂蚕蛹粉按其溶解性的不同进行连续累进提取。

按照水、70%乙醇、3% NaCl、0.1% NaOH 的溶剂顺序进行连续提取,料液比 1:10,电磁力搅拌 3 h,30℃、100 W 超声 30 min,5 000 r/min 离心 10 min,提取液调节 pH 至等电点,沉淀透析 48 h 后冷冻干燥,即得各类可溶性蚕蛹蛋白。洗涤离心沉淀物至中性,通过 200 目滤布过滤除去蛹壳,冷冻干燥得不溶性蚕蛹蛋白。按下式计算各类蛋白相对含量。

$$\text{蛋白相对含量} = \frac{m}{m_0} \times 100\%$$

式中: m 为各类蛋白质量; m_0 为总蛋白质量。

1.2.5 气相色谱-质谱法分析蚕蛹油脂肪酸组成

甲酯化:称取约 0.5 g 蚕蛹油,加入 5 mL 0.5 mol/L NaOH-甲醇溶液,35℃ 水浴振摇反应 1 h,加入 0.5 g 无水 Na₂SO₄ 及 5 mL 正己烷密封,4℃ 反应 24 h 后,将上清液用 0.22 μm 滤膜过滤,收集滤液,用于气相色谱-质谱分析。

气相色谱条件:DB-5 色谱柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm);采用程序升温,初始温度 150℃ 保留 5 min,3℃/min 升温至 230℃,保留 10 min;进样口温度 250℃;检测器温度 280℃;载气流量 20 mL/min;进样量 1 μL;分流比 20:1。

质谱条件:离子源温度 250℃;接口温度 250℃;溶剂延迟时间 3 min;检测器电压 0.1 kV。

由 NIST08 标准质谱图数据库鉴定脂肪酸成分,按峰面积归一化法计算脂肪酸相对含量。

1.2.6 可溶性蛋白等电点的测定

参照王青松等^[20]方法,略作修改。首先采用微量紫外分光光度计测定各类可溶性蛋白提取液的蛋白质质量浓度,将 pH 分别调节至 2、3、4、5、6 后,5 000 r/min 离心 10 min,利用微量紫外分光光度计测定上清液的蛋白质质量浓度。然后在最低质量浓度的 pH 附近设定一个范围,在此范围内以 0.2 个 pH 为梯度单位,调节 pH 后离心,测定上清液蛋白质质量浓度,确定质量浓度最小的 pH 为等电点。重复测定 3 次。

1.2.7 SDS-PAGE 测定蚕蛹蛋白相对分子质量

参照杨晖等^[21]的方法并略作修改。

(1)样品前处理:将水溶性、醇溶性、盐溶性蛋白配制成 5 mg/mL 溶液,与 4×loading buffer 按照 1:4 的比例混合均匀;称取适量的碱溶性、不溶性蛋白,加入等体积的 1 mol/L DTT 和 2×loading buffer,超声溶解 30 min,离心取上清液。将各类混合液于沸水中煮沸 5 min 后立即放入 4℃ 冰箱快速冷却。

(2)制备 12% 的分离胶,5% 的浓缩胶。

(3)上样 Marker 和样品各 10 μL,先以 15 mA 恒流电泳,待样品跑到分离胶后,将电流增至 25 mA,当溴酚蓝跑到分离胶底部时停止电泳。考马斯亮蓝 R-250 染色 1 h 后脱色,每 30 min 换一次脱色液直至蛋白条带清晰,用凝胶成像系统拍摄电泳图谱分析。

1.2.8 液相色谱-质谱法鉴定蚕蛹蛋白潜在过敏原

样品前处理:将约 300 μg 蛋白样品加入 200 μL 8 mol/L 尿素中,混匀,室温离心 20 min,重复几次,加入 4 μL 1 mol/L DTT、150 μL 8 mol/L 尿素,37℃ 温育 2 h,加入 15 μL 1 mol/L 碘乙酰胺,室温下避光 1 h,离心 20 min。加入 200 μL 8 mol/L 尿素离心,重复几次,再加入 200 μL 50 mmol/L NH₄HCO₃ 溶液离心,重复几次,用 400 μL 10 μg/mL 胰蛋白酶酶解(37℃,36 h),离心 20 min,加入 40 μL 50 mmol/L NH₄HCO₃ 溶液,4℃ 离心,冷冻干燥,得到肽段。以上离心过程均取上清。

肽段脱盐:肽段样品用 200 μL 0.1% 三氟乙酸复溶,利用 Zip Tip C18 微量脱盐柱,使样品中的肽段与脱盐柱结合。将脱盐柱上结合的肽段洗下,4℃ 离心,冷冻干燥,得到脱盐后的肽段。

上机液制备:将脱盐后的肽段用 0.1% 甲酸水溶液进行复溶,振荡 30 s,室温离心 10 min,吸上清 15 μL 于上样瓶中。

液相色谱条件:上样量为 2 μL,吸样流速为

8 $\mu\text{L}/\text{min}$, 使用 3.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速将 16 μL A 相溶液(0.1% 甲酸水)推入预柱(100 $\mu\text{m} \times 2 \text{ cm}$, C_{18} , 5 μm , 100 \AA , nanoViper,)和分析柱(50 $\mu\text{m} \times 15 \text{ cm}$, C_{18} , 2 μm , 100 \AA , nanoViper)中,肽段分离用梯度 B 相溶液(0.1% 甲酸-乙腈)进行洗脱,流速为 250 nL/min。有效色谱梯度时间为 60 min 线性梯度。

质谱条件:检测时间 0 ~ 60 min,喷雾电压 2.3 kV,离子传输管温度 275 $^{\circ}\text{C}$;离子模式为正离子模式,默认电荷为两个,全扫描的分辨率 70 000,扫描范围(m/z)300 ~ 1 800,二级扫描分辨率 17 500,采用 Top 20 进行数据采集,动态排除时间 30 s。质谱环境温度 22 $^{\circ}\text{C}$,空气湿度 50%。

质谱数据匹配:原始数据采用 MaxQuant (版本 1.3.0.5) 搜库,数据库为 2016 年 7 月从 NCBI 和 SilkDB 下载,这两个数据库共包含 32 835 条家蚕蛋白质序列。搜库参数为可变修饰选择 Oxidation (M) 和 Acetyl (Protein N-term),酶切位点选择 Trypsin/P,最大漏切位点为两个,最大带电荷数为 7,Protein FDR 为 0.01,最小肽段长度为 6。得到的数据去除污染序列数据和反向序列数据后,即得到原始数据导出到 Excel,可用于后续分析。按下式计算过敏原相对含量。

$$\text{过敏原相对含量} = \frac{iBAQ}{iBAQ_0} \times 100\%$$

式中: $iBAQ$ 为过敏原丰度; $iBAQ_0$ 为总蛋白丰度。

1.2.9 数据分析

采用软件 Origin9.0 和 Excel 对数据进行统计与分析,结果用“平均值 \pm 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 鲜蚕蛹主要成分(见表 1)

表 1 鲜蚕蛹主要成分 %

水分	蛋白质	脂肪	灰分	总糖
74.63 \pm 0.07	14.30 \pm 0.06	6.82 \pm 0.02	1.44 \pm 0.10	1.14 \pm 0.13

由表 1 可知,鲜蚕蛹水分含量为 74.63%,蛋白质含量为 14.30%,脂肪含量为 6.82%,灰分含量为 1.44%,总糖含量仅为 1.14%。由此可知,蚕蛹干基蛋白质含量达到 56.37%,脂肪含量为 26.88%,是鲜蚕蛹的主要营养物质,蚕蛹食品的发展应该围绕着蛋白和脂肪进行进一步的研究。

2.2 蚕蛹油主要脂肪酸组成(见表 2)

从表 2 可以看出,蚕蛹油中主要含有 11 种脂肪酸,以不饱和脂肪酸为主,相对含量为 60.83%,饱和脂肪酸占 35.64%。蔡沙^[2]、张研宇^[3]等检测的

蚕蛹油中不饱和脂肪酸含量略高于本实验测定结果,可能与采用的检测方法不同及家蚕的品种、饲养条件及地域差异相关。

表 2 蚕蛹油主要脂肪酸组成 %

脂肪酸	相对含量	脂肪酸	相对含量
月桂酸	0.21 \pm 0.015	二十烷酸	0.26 \pm 0.021
豆蔻酸	0.01 \pm 0.001	棕榈油酸	2.31 \pm 0.026
棕榈酸	22.63 \pm 0.036	油酸	35.43 \pm 0.147
十七烷酸	10.54 \pm 0.174	亚油酸	2.92 \pm 0.045
硬脂酸	1.17 \pm 0.021	α -亚麻酸	20.17 \pm 0.089
十九烷酸	0.82 \pm 0.031		

蚕蛹油中的不饱和脂肪酸包括棕榈油酸、油酸、亚油酸、 α -亚麻酸,油酸的相对含量高达 35.43%,其次为 α -亚麻酸,相对含量为 20.17%。棕榈油酸和油酸对降低血压、血脂、血糖有明显的作用,还有保护心脏以及预防心血管疾病的作用^[22-23];亚油酸和 α -亚麻酸是必需脂肪酸,可以调节机体的脂类代谢和免疫力,同时还能够预防和治疗心血管疾病,预防癌症、促进机体生长发育以及调控基因的表达等^[24]。

2.3 可溶性蚕蛹蛋白等电点(见图 1 ~ 图 4)

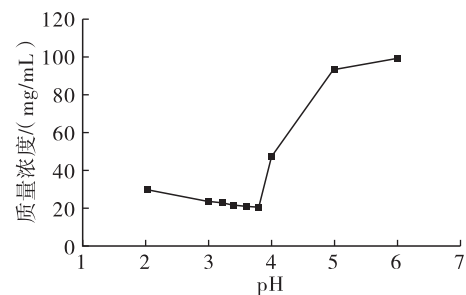


图 1 水溶性蛋白等电点

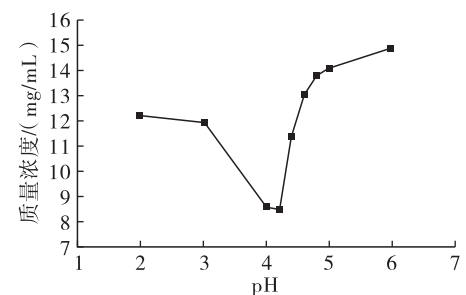


图 2 醇溶性蛋白等电点

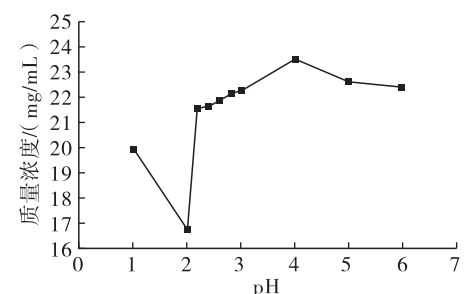


图 3 盐溶性蛋白等电点

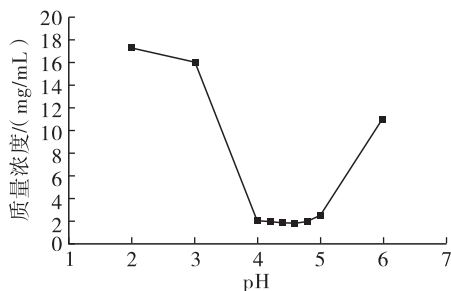


图4 碱溶性蛋白等电点

由图1~图4可知,水溶性蛋白的等电点是3.8,醇溶性蛋白的等电点是4.2,盐溶性蛋白等电点是2.0,碱溶性蛋白等电点是4.4附近。由此可见,蚕蛹中几种蛋白等电点主要分布在酸性一侧,醇溶性蛋白和碱溶性蛋白的等电点与常用的大豆蛋白的等电点比较接近,但水溶性蛋白和盐溶性蛋白等电点相对较低,表明了这两种蛋白在弱酸性体系下更加稳定,更适合在偏酸性食品加工中添加使用。

2.4 不同种类蚕蛹蛋白相对含量

不同溶解性的蚕蛹蛋白相对含量如表3所示。

表3 各类蛋白相对含量

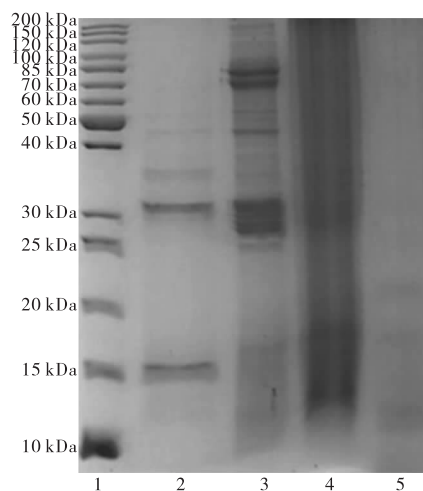
蚕蛹蛋白	相对含量/%
水溶性蛋白	23.63 ± 0.07
醇溶性蛋白	1.06 ± 0.06
盐溶性蛋白	2.58 ± 0.02
碱溶性蛋白	19.73 ± 0.10
不溶性蛋白	53.00 ± 0.13

由表3可知,不溶性蛋白相对含量最高,占53.00%,其次为水溶性蛋白,相对含量为23.63%,碱溶性蛋白相对含量为19.73%,盐溶性蛋白和醇溶性蛋白相对含量较低,分别为2.58%和1.06%。这些蛋白拥有不同的功能特性,如水溶性蛋白溶解性较好,可应用于功能蛋白饮料的开发;盐溶性蛋白持油性较好,可应用于肉制品加工中的保油处理;醇溶性蛋白乳化性较好,更适合应用于食品乳化体系中。由于蚕蛹蛋白存在过敏原,容易引发食品安全事件,因此需对各类蛋白潜在过敏原的分布进行探究与分析,为其安全利用提供理论依据。

2.5 各类蛋白相对分子质量分布(见图5、图6)

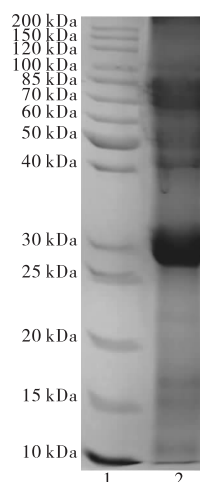
由图5可知,盐溶性蛋白亚基主要分布在15~35 kDa之间,其中15 kDa和32 kDa的组分含量较高,35 kDa附近还有一个亚基,含量相对较低。水溶性蛋白亚基主要分布在25~85 kDa范围内,其中含量较高的亚基包括25~32 kDa和75~85 kDa范围内的组分,48 kDa附近还有一个含量较高的亚基,其他组分含量较低。碱溶性蛋白亚基主要分布

在13~29 kDa之间,含量较高亚基组分在13、17、29 kDa。碱溶性蛋白的条带背景颜色较深,可能是残留的碱与染色剂之间的反应造成拖尾现象。醇溶性蛋白相对分子质量都在20 kDa以下,亚基主要分布在12 kDa和20 kDa附近,为小分子物质,条带的颜色较浅,可能是由于乙醇的存在,蛋白溶液与缓冲液混合后的样液进样时不能完全地进入电泳孔。由图6可知,不溶性蛋白亚基分布在27~85 kDa之间,其中27~32 kDa和70~85 kDa范围内的组分含量较高,40~50 kDa亚基含量较低,此外在12~17 kDa也有少量的亚基分布。综上分析可知蚕蛹蛋白中小分子蛋白居多。



注:1. Marker; 2. 盐溶性蛋白; 3. 水溶性蛋白; 4. 碱溶性蛋白; 5. 醇溶性蛋白。

图5 可溶性蛋白 SDS-PAGE 图谱



注:1. Marker; 2. 不溶性蛋白。

图6 不溶性蛋白 SDS-PAGE 图谱

2.6 蚕蛹蛋白潜在过敏原分布(见表4)

由表4可知,水溶性、醇溶性、盐溶性、碱溶性蛋白及不溶性蛋白中致敏蛋白相对含量分别为1.33%、25.64%、1.21%、17.93%和9.86%。蚕蛹

蛋白中共匹配出 8 类已经有免疫反应的潜在过敏原,包括 30K 家族蛋白、几丁质酶、卵黄原蛋白、热休克蛋白、表皮蛋白、硫醇过氧化还原酶、化学感受蛋白和 LOC 蛋白,其中 30K 家族蛋白包括 4 种,表皮蛋白包括 2 种。致敏蛋白分布结果显示,各类蛋白均有过敏原存在:醇溶性蛋白中致敏蛋白相对含量最高,达到 25.64%,所包括的致敏蛋白种类也较多,有 3 种 30K 家族蛋白、2 种表皮蛋白、热休克蛋白、化学感受蛋白和 LOC 蛋白;碱溶性蛋白中所含致敏蛋白种类最多,有 4 种 30K 家族蛋白、2 种表皮蛋白、几丁质酶、卵黄原蛋白、热休克蛋白、硫醇过氧

化还原酶、化学感受蛋白和 LOC 蛋白,相对含量也达到 17.93%;不溶性蛋白中致敏蛋白相对含量为 9.86%,种类较少,仅存在 2 种 30K 家族蛋白和硫醇过氧化还原酶,且这 3 种都是在碱溶性蛋白中大量检出的,推测可能是碱溶性蛋白未充分洗涤而造成的残留;水溶性蛋白和盐溶性蛋白中所含致敏蛋白种类也较多,分别包括 3 种 30K 家族蛋白、1 种表皮蛋白、几丁质酶、化学感受蛋白和 3 种 30K 家族蛋白、2 种表皮蛋白、几丁质酶、热休克蛋白、化学感受蛋白,但相对含量较少,分别为 1.33% 和 1.21%。

表 4 蚕蛹蛋白潜在过敏原分布

分类	Protein ID	相对分子质量/kDa	丰度				
			水溶性蛋白	醇溶性蛋白	盐溶性蛋白	碱溶性蛋白	不溶性蛋白
30K 家族蛋白	BGIBMGA004399	29.25	1 558 000	11 113 000	580 700	1 064 900 000	-
	BGIBMGA004394	29.73	10 023 000	14 375 000	21 607 000	5 039 100 000	24 100 000
	reflNP_001095199.1	28.68	-	-	-	383 000 000	-
	reflNP_001095197.1	29.41	2 041 000	40 568 000	3 932 600	2 888 300 000	996 710
几丁质酶	reflNP_001166832.1	61.07	879 230	-	493 150	12 215 000	-
卵黄原蛋白	reflNP_001037309.1	203.05	-	-	-	586 510	-
热休克蛋白	BGIBMGA004541	20.43	-	17 777 000	4 506 900	457 570 000	-
表皮蛋白	reflNP_001166748.1	21.46	23 762 000	33 149 000 000	46 748 000	1 536 400 000	-
	BGIBMGA003062	18.51	-	29 089 000	3 781 400	519 420 000	-
硫醇过氧化还原酶	BGIBMGA002186	21.92	-	-	-	103 570 000	188 000
化学感受蛋白	BGIBMGA004065	14.26	24 751 000	13 670 000	53 361 000	71 003 000	-
LOC 蛋白	reflXP_021205460.1	28.16	-	226 910	-	43 049 000	-
过敏原	-	-	63 014 230	33 275 818 910	135 010 750	12 119 113 510	25 284 710
总蛋白	-	-	4 734 382 336	129 782 988 532	11 198 110 712	67 609 969 020	256 308 393

注: BGI 序列来自 SilkDB 数据库; ref 序列来自 NCBI 数据库; “-”表示未发现、未检出。

从过敏原的检出种类来看, 30K 家族蛋白在 5 类蛋白中均有分布, 表皮蛋白和化学感受蛋白在 4 类可溶性蛋白中均检出, 几丁质酶在水溶性、盐溶性、醇溶性 3 类蛋白中存在, 热休克蛋白在醇溶性、盐溶性、碱溶性 3 类蛋白中检出, LOC 蛋白在醇溶性、碱溶性 2 类蛋白中检出, 在碱溶性蛋白和不溶性蛋白中检出硫醇过氧化还原酶, 仅在碱溶性蛋白中检出卵黄原蛋白。由此可见 30K 家族蛋白是蚕蛹蛋白中主要的潜在过敏原, 在 5 类蛋白中均存在。Zuo 等^[25]研究表明 30K 家族蛋白中的 Bom m 9 是一种与哮喘相关过敏原, 参与了哮喘的发病机制, 并成功以这种蛋白构建了过敏性哮喘的小鼠模型。

基于以上数据分析, 在食品工业的应用中, 水溶性蛋白和盐溶性蛋白过敏原含量很低, 适合直接开发蛋白产品或者用于食品添加。不溶性蛋白中所含过敏原种类较少, 且经过充分碱洗后, 可以作为食品加工过程中用于改善产品功能特性的添加物使用,

但同时应注明可能存在的过敏原。醇溶性蛋白和碱溶性蛋白中过敏原含量较高, 必须经过脱敏处理后才能进行相关的应用, 活性肽的开发是较好的应用方向, 因为酶解是一种很好的脱敏方法。

3 结论

(1) 蚕蛹油中脂肪酸以不饱和脂肪酸为主, 占 60.83%, 其中油酸的相对含量最高, 达到 35.43%。

(2) 蚕蛹蛋白中不溶性蛋白相对含量最高, 为 53.00%, 蛋白亚基主要分布在 27~32 kDa 和 70~85 kDa 之间; 水溶性蛋白占 23.63%, 等电点为 3.8, 蛋白亚基主要分布在 25~32 kDa 和 75~85 kDa 之间; 碱溶性蛋白占 19.73%, 等电点为 4.4, 蛋白亚基主要分布在 13~29 kDa 之间; 盐溶性蛋白占 2.58%, 等电点为 2.0, 蛋白亚基主要分布在 15~35 kDa 之间; 醇溶性蛋白仅占 1.06%, 等电点为 4.2, 蛋白亚基主要分布在 12 kDa 和 20 kDa 附近。

(3) 过敏原分布显示, 过敏原相对含量最高的是醇溶性蛋白, 为 25.64%, 共检出 8 种过敏原; 其

次为碱溶性蛋白,过敏原相对含量达到 17.93%,检出 12 种过敏原;不溶性蛋白中仅检出 3 种过敏原,相对含量为 9.86%;水溶性蛋白和盐溶性蛋白过敏原相对含量较低,分别为 1.33% 和 1.21%。考虑到食品安全问题,在食品应用中过敏原含量低的水溶性蛋白和盐溶性蛋白有直接添加的可能;不溶性蛋白经过充分碱洗后,可以作为食品加工过程中用于改善产品功能特性的添加物使用;醇溶性蛋白和碱溶性蛋白必须经过脱敏处理才能进行进一步的开发与利用。

参考文献:

- [1] 胡建平,刘可桃. 蚕蛹蛋白的提取工艺及综合利用研究进展[J]. 安徽农学通报,2011, 17(11):185-186.
- [2] 蔡沙,何建军,施建斌,等. 蚕蛹油的提取及其组分分析[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(8):239-243.
- [3] 张研宇,李建科. 蚕蛹油提取、精炼及其脂肪酸组成分析[J]. 中国油脂,2010,35(6):76-79.
- [4] 吕汶骏,赵钟兴,廖丹葵,等. 蚕蛹蛋白及其水解产物中氨基酸组成分析[J]. 食品科学, 2012, 33(12):228-232.
- [5] JIA J, WU Q, YAN H, et al. Purification and molecular docking study of a novel angiotensin - I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from alcalase hydrolysate of ultrasonic - pretreated silkworm pupa (*Bombyx mori*) protein [J]. Process Biochem, 2015, 50(5):876-883.
- [6] 练钊,刘小玲. 缫丝蚕蛹 4 种蛋白质的提取及功能性质[J]. 食品科技, 2018(5):287-292.
- [7] 刘硕. 家蚕蚕蛹过敏原蛋白质组学和分子生物学研究[D]. 南昌:南昌大学医学院, 2010.
- [8] 袁水林,邹丽,穆利霞,等. 蚕蛹蛋白过敏与综合利用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(18):375-380.
- [9] 唐健,赵国栋,钱荷英,等. 家蚕致敏原蛋白的研究进展[J]. 中国蚕业,2018, 39(3):52-56.
- [10] 刘志刚,张杰,林格. 家蚕 30kD 特异性变应原的分析、纯化与质谱鉴定[J]. 昆虫学报, 2007, 50(2):101-105.
- [11] 曹会,蔡德丰,杨平常,等. 家蚕 MBP - Bmlp7 蛋白的克隆表达及免疫学鉴定[J]. 深圳大学学报(理工版), 2017, 34(2):117-121.
- [12] WANG H, HU W, LIANG Z, et al. Thiol peroxidoredoxin a novel allergen from *Bombyx mori*, modulates functions of macrophages and dendritic cells [J]. Am J Transl Res, 2016, 8(12):5320-5329.
- [13] 刘硕,黄钟,罗新萍,等. 家蚕蚕蛹过敏原几丁质酶基因的克隆和原核表达载体的构建[J]. 热带医学杂志, 2010, 10(5):520-523.
- [14] ZHAO X, LI L, KUANG Z, et al. Proteomic and immunological identification of two new allergens from silkworm (*Bombyx mori* L.) pupae[J]. Cent Eur J Immunol, 2015, 40(1):30-34.
- [15] 胡维,梁志林,王良录,等. 家蚕蚕蛹过敏原 CPH30 的表达、纯化、免疫学鉴定及 B 细胞抗原表位预测[J]. 昆虫学报, 2016, 59(4):377-381.
- [16] 梁志林,李平,刘志刚. 家蚕蚕蛹过敏原表皮蛋白 RR-2 基序 63 前体 (CPR63) 的克隆表达、纯化鉴定及生物信息学分析[J]. 免疫学杂志, 2016(7):565-569.
- [17] 梁志林,刘晓宇,刘志刚,等. 家蚕蚕蛹基因 LOC101743840 的原核表达、免疫学鉴定及生物信息学分析[J]. 中国热带医学, 2017, 17(7):641-645.
- [18] YONG J K, MINA S, YONG L J, et al. Allergenic characterization of 27 - kDa glycoprotein, a novel heat stable allergen, from the pupa of silkworm, *Bombyx mori*[J]. J Korean Med Sci, 2016,31(1):18-24.
- [19] 胡新中,郑建梅,魏益民,等. 蛋白质组分析方法比较研究[J]. 中国粮油学报, 2005, 20(4):12-16.
- [20] 王青松,肖安红,韩立娟,等. 萝卜籽蛋白提取及其功能性质研究[J]. 中国油脂, 2018,43(3):26-29.
- [21] 杨晖,马良,韩霜,等. 甘油添加量对兔皮明胶膜性能与结构的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(17):14-18.
- [22] 王娜. 单不饱和脂肪酸对心血管疾病的作用机制[J]. 中国实用医药, 2010, 5(23):256-257.
- [23] 张伟敏,钟耕,王炜. 单不饱和脂肪酸营养及其生理功能研究概况[J]. 粮食与油脂, 2005(3):13-15.
- [24] 张晓图,杜晨红,丁小娟,等. 多不饱和脂肪酸的生物化学功能及其在动物生产中的应用[J]. 动物营养学报, 2017(9):47-55.
- [25] ZUO J, LEI M, YANG R. Bom m 9 from *Bombyx mori* is a novel protein related to asthma[J]. Microbiol Immunol, 2015, 59(7):410-418.