

低次烟叶中蛋白质提取工艺优化及氨基酸分析研究

赵谋明, 饶国华, 林伟锋, 杨晓泉

(华南理工大学轻工与食品学院, 广州 510640)

摘要: 为了充分综合利用低次烟叶蛋白资源, 采用碱溶酸沉法对低次烟叶中蛋白质的提取工艺进行了研究, 并利用高效液相色谱系统对其氨基酸组成进行了分析。研究表明: 烟叶磨浆的最佳工艺为固液比 1:17, 提取温度 60℃, 提取液 pH 值 8.0, 磨浆两次; 烟叶蛋白碱溶最佳工艺为温度 60℃, pH8.0, 时间 60 min, 搅拌条件下碱溶提取 3 次; 烟叶蛋白酸沉工艺中, 在 pH3.0, 4℃下静置 8 h 效果最佳, 烟叶蛋白酸沉提取率最高为 86.71%; 烟叶蛋白的氨基酸分析结果显示, 烟叶蛋白的氨基酸组成种类齐全, 必需氨基酸含量较高, 氨基酸分数较高, 表明低次烟叶蛋白是一类比较优质的蛋白质资源。

关键词: 低次烟叶; 蛋白质; 提取率; 氨基酸

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2006)01-0142-05

赵谋明, 饶国华, 林伟锋, 等. 低次烟叶中蛋白质提取工艺优化及氨基酸分析研究[J]. 农业工程学报, 2006, 22(1): 142-146.
Zhao Mouming, Rao Guohua, Lin Weifeng, et al. Optimization of extraction technology and amino acid analysis of protein extracted from discarded tobacco leaf[J]. Transactions of the CSAE, 2006, 22(1): 142-146. (in Chinese with English abstract)

0 引言

烟草 (*Nicotiana tabacum* L.), 茄科烟草属植物, 共有 60 余种, 人类栽培多为红花种和黄花种^[1,2]。烟叶中成分含量非常复杂, 其中以蛋白质含量最为丰富, 如白肋烟中蛋白质含量高达 20.48%^[3]。随着对叶蛋白研究的不断深入, 人们逐渐认识到植物叶是丰富的优质植物蛋白资源之一^[4]。据报道, 植物叶蛋白尤以烟叶中可溶性蛋白含量较高, 具有较高的营养价值和药用价值, 并且逐步被作为一种食品蛋白来源应用到食品领域中^[5-7]。从食品和营养的角度来说, 烟叶蛋白的氨基酸组成和含量相当丰富、均衡, 通过多种高新技术精深加工后, 可获得生物活性肽和氨基酸等高附加值产品^[8]。前人都是以新鲜烟叶为原料, 采用水浸提法或者专利技术提取其中的蛋白质。然而, 在烟草种植和加工过程中, 产生了大量的低次烟叶, 占烟草总产量的 25% 左右, 这部分低次烟叶除少量用于生产烟膏和农药外, 大部分弃之无用, 既浪费了资源, 又污染了环境, 但有关低次烟叶蛋白资源的综合利用很少报道^[1]。

本文以低次烟叶为原料, 采用碱溶酸沉法从中提取蛋白质, 优化其提取工艺, 并对所提取出蛋白质的氨基酸组成进行了分析, 旨在为低次烟叶蛋白资源的综合开发利用提供技术参数和理论指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

晒烟, B1K 级 (低次级), 广东产, 取整片烟叶 (去除叶梗、叶脉) 用 MJ-176NR 型搅拌机打碎, 采用其碎

片进行试验; KOH, H₃PO₄, Cl₃CCOOH 均为分析纯。

1.2 主要设备

精密 pH 计 (PHS-3C 型, 上海雷兹仪器厂), 搅拌机 (MJ-176NR 型, 日本松下电器产业株式会社), 胶体磨 (温州市欧海振业食品机械厂), 强力电动搅拌机 (JB200-D 型, 上海标本模型厂), 数显恒温水浴锅 (上海仪表集团供销公司), 高速冷冻离心机 (CR22G 型, 日本 HITACHI 公司), 全自动凯氏定氮仪 (瑞士 Büchi Labortechnik AG), 高效液相色谱系统 (美国 Waters 公司)。

1.3 试验方法

1) 烟叶蛋白提取方法: 碱溶酸沉法^[9], 采用氢氧化钾和磷酸调整 pH 值, 主要流程如下:

烟叶 → 捣碎 → 加水 → 胶体磨磨浆 → 碱溶第一次 → 200 目滤布过滤 → 再碱溶第二、第三次 → 离心 (4800 r/min, 20℃, 30 min) 除杂 → 酸沉 → 离心 (4800 r/min, 4℃, 30 min) 沉淀蛋白。

2) 总氮的测定: 常量凯氏定氮法^[10]。

3) 非蛋白氮 (NPN) 的测定: 三氯乙酸法^[11,12]。经测定, 晒烟 B1K 级中蛋白质含量为 8.05%。

4) 计算方法

磨浆过程中蛋白提取率 = 磨浆提取出的总蛋白质 ÷ 烟叶原料中总蛋白质 × 100%

碱溶过程中蛋白提取率 = 碱溶提取出的总蛋白质 ÷ 烟叶原料中总蛋白质 × 100%

酸沉过程中蛋白提取率 = 酸沉提取出的总蛋白质 ÷ 碱溶提取出的总蛋白质 × 100%

5) 氨基酸分析方法: 采用高效液相色谱和 PICO-TAG 氨基酸分析柱对经强酸处理和强碱处理的烟叶蛋白分别进行测定, 分析条件: 38℃、流速 1 mL/min、检测波长 254 nm。

2 结果与分析

收稿日期: 2005-04-21 修订日期: 2005-12-21

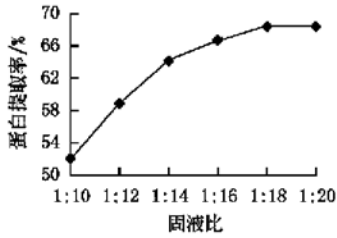
基金项目: 广东省烟草专卖局重大科研项目 (粤烟科 2003) 17 号)

作者简介: 赵谋明 (1964-), 男, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事食品生物技术及资源综合利用研究。广州 华南理工大学轻工与食品学院, 510640。Email: femmzhao@scut.edu.cn

2.1 磨浆工艺研究

为提高烟叶蛋白的提取率, 在提取蛋白之前, 烟叶必须进行磨浆处理, 减小烟叶颗粒的粒度。在磨浆工艺中, 固液比(烟叶:水)、提取温度、提取液 pH 值和磨浆次数这 4 个因素对烟叶蛋白提取率均有直接影响^[13]。

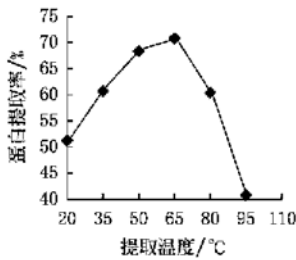
因此, 对磨浆工艺中固液比、提取温度、提取液 pH 值和磨浆次数 4 个因素分别进行试验, 测定烟叶蛋白提取率, 重复 3 次, 确定最佳工艺参数。试验结果如图 1、图 2、图 3、图 4 所示。



(提取温度 50℃, pH7.0, 磨浆 3 次)

图 1 磨浆工艺中固液比对蛋白提取率的影响

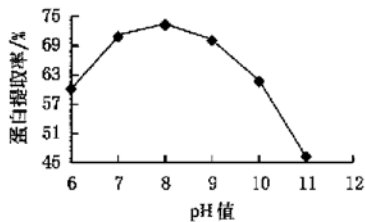
Fig. 1 Effect of the ratio of tobacco leaf to water on protein extraction rate



(固液比 1:18, pH7.0, 磨浆 3 次)

图 2 磨浆工艺中提取温度对蛋白提取率的影响

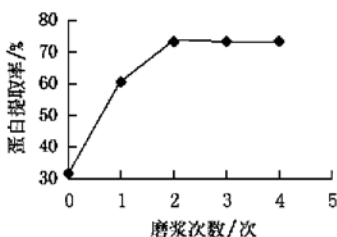
Fig. 2 Effect of extracting temperature on protein extraction rate



(固液比 1:18, 提取温度 65℃, 磨浆 3 次)

图 3 磨浆工艺中提取液 pH 值对蛋白提取率的影响

Fig. 3 Effect of pH value on protein extraction rate



(固液比 1:18, 温度 65℃, pH8.0)

图 4 磨浆工艺中磨浆次数对蛋白提取率的影响

Fig. 4 Effect of grinding time on protein extraction rate

从图 1 可以看出, 烟叶蛋白磨浆提取率随固液比的增大而提高, 当固液比为 1:18 时, 蛋白磨浆提取率最高为 68.38%。当再增大固液比时, 蛋白提取率变化不大。图 2 表明, 磨浆工艺中提取温度对烟叶蛋白提取率影响比较明显。蛋白提取率随提取温度的升高而增大, 在 65℃ 时, 烟叶蛋白提取率达到最高为 70.82%。而当提取温度进一步升高时, 蛋白提取率反而下降, 原因是温度太高时, 可能有部分烟叶蛋白发生变性沉淀而被离心除去。图 3 显示, 提取液 pH 值对烟叶蛋白磨浆提取率的影响比较显著。当提取液 pH 值从 6.0 上升至 8.0 时, 蛋白提取率随之上升并达到最高。提取液 pH 值通过影响蛋白质的水化作用而直接影响蛋白质在水中的溶解度, 在 pH8.0 时, 蛋白质的水化作用非常强, 溶解度最大, 因而烟叶蛋白磨浆提取率最高^[14]。图 4 表明烟叶蛋白提取率随磨浆次数的增多而明显上升, 但磨浆两次后, 再增加磨浆次数时, 蛋白提取率上升的幅度趋于平缓, 可能是粒度足够小以后对烟叶蛋白提取率影响就不大了。

为了确定磨浆工艺中固液比、提取温度和提取液 pH 值这三个因素的最佳工艺参数, 按表 1 所设置的因素和水平进行磨浆工艺正交试验(磨浆 2 次), 结果见表 1。

表 1 磨浆工艺正交试验设计 L₉(3⁴) 与结果
Table 1 Orthogonal experiment design methods L₉(3⁴) and results

试验号	A 固液比	B 提取温度/°C	C 提取液 pH 值	蛋白提取率 /%
1	1(1:17)	1(60)	1(7.5)	76.75
2	1	2(65)	2(8.0)	73.68
3	1	3(70)	3(8.5)	65.21
4	2(1:18)	1	2	77.30
5	2	2	3	71.57
6	2	3	1	64.14
7	3(1:19)	1	3	77.12
8	3	2	1	69.03
9	3	3	2	66.79
K ₁	215.64	231.17	209.92	
K ₂	213.01	214.28	217.77	
K ₃	212.94	196.14	213.90	
k ₁	71.88	77.06	69.97	
k ₂	71.00	71.43	72.59	
k ₃	70.98	65.38	71.30	
最优水平	A ₁	B ₁	C ₂	
R	0.90	11.68	2.62	

表 1 表明, 磨浆工艺的最优水平组合为: A₁B₁C₂, 即固液比 1:17, 提取温度 60℃, 提取液 pH8.0。影响烟叶蛋白磨浆提取率的因素显著(R 值) 次序为: 提取温度 > 提取液 pH 值 > 固液比。A₁B₁C₂ 这一最佳组合在正交试验中没有出现, 通过采用磨浆工艺最优水平参数进行试验, 得到烟叶蛋白磨浆提取率为 77.59%, 比表 1 中最高提取率 77.30% 还高, 这进一步验证了正交试验结果的准确性和可靠性。

为了分析正交试验中各因素水平的差异, 对试验结

果进行了方差分析, 结果见表 2。

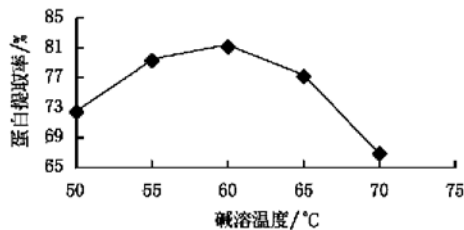
表 2 正交试验的方差分析
Table 2 Variance analysis table of orthogonal experimental results

差异来源	偏差平方和	自由度	均方	F	F _{0.05}	F _{0.01}	显著性
A (固液比)	1.58	2	0.79	0.58	19.00	99.00	
B (提取温度)	204.60	2	102.30	75.67	19.00	99.00	*
C (pH)	10.27	2	5.14	3.80	19.00	99.00	
误差	2.70	2	1.35				
总变异	219.15	8					

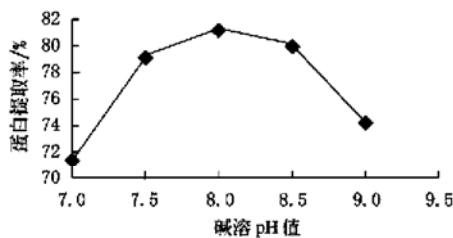
表 2 的分析结果显示, 提取温度对烟叶蛋白磨浆提取率的影响显著, 提取液 pH 值和固液比在此试验范围内对提取率没有显著影响, 这与直观分析结果相吻合。因此, 在此磨浆工艺最优水平参数的基础上进行后面的试验。

2.2 碱溶工艺研究

在碱溶工艺中, 碱溶温度、pH 值、时间和碱溶次数等直接影响烟叶蛋白的高效提取^[15]。为了得到碱溶工艺的最佳参数, 对以上 4 个因素依次进行试验, 结果见图 5、图 6、图 7、和图 8。



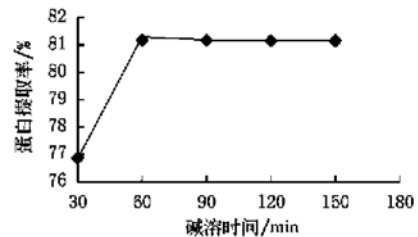
(pH8.0, 2 h, 碱溶 2 次, 搅拌)
图 5 碱溶温度对烟叶蛋白提取率的影响
Fig. 5 Effect of solution temperature on protein extraction rate



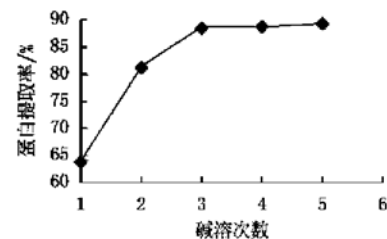
(60°C, 2h, 碱溶 2 次, 搅拌)
图 6 碱溶 pH 值对烟叶蛋白提取率的影响
Fig. 6 Effect of solution pH value on protein extraction rate

图 5 表明, 碱溶过程中烟叶蛋白提取率随温度的升高而提高, 在 60°C 时蛋白提取率上升至最高; 温度再升高时, 蛋白碱溶提取率反而下降, 这跟蛋白质的部分热变性密切相关。因此, 60°C 为碱溶工艺的最佳温度。图

6 显示, 碱溶 pH 值在 8.0 时, 蛋白提取率最高为 81.17%, 在此 pH 值下烟叶蛋白的水化作用可能最强, 因而溶解度最大。所以, pH8.0 适合碱溶工艺操作。从图 7 可以看出, 碱溶时间的增加伴随着烟叶蛋白提取率的迅速上升, 在 60 min 以后再延长碱溶时间, 对烟叶蛋白提取率影响甚微, 因而 60 min 为最佳碱溶时间。图 8 表明, 刚开始随着碱溶次数的增加, 烟叶蛋白提取率呈直线上升, 在碱溶 3 次以后, 蛋白提取率几乎没有变化。因此, 烟叶碱溶操作的最佳工艺为: 温度 60°C, pH8.0, 时间 60 min, 搅拌条件下碱溶三次, 烟叶蛋白碱溶提取率最高为 88.49%。因此, 采用此优化的碱溶工艺参数进行后面的试验。



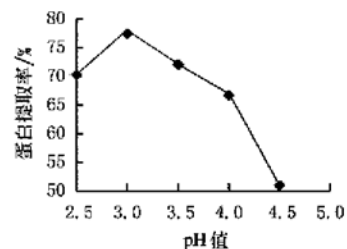
(60°C, 2 h, 碱溶 2 次, 搅拌)
图 7 碱溶时间对烟叶蛋白提取率的影响
Fig. 7 Effect of extracting time on protein extraction rate



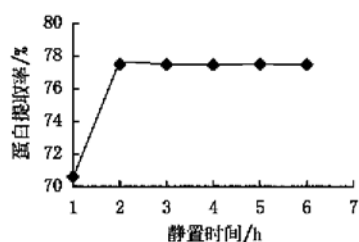
(60°C, pH8.0, 1 h, 搅拌)
图 8 碱溶次数对烟叶蛋白提取率的影响
Fig. 8 Effect of extracting time on protein extraction rate

2.3 酸沉工艺研究

在烟叶蛋白酸沉工艺中, 烟叶蛋白酸沉提取率与酸沉 pH 值, 静置时间和静置温度直接相关^[15]。本试验中, 对其三因素分别进行了研究, 结果如图 9, 图 10 和表 3 所示。



(常温静置 4h)
图 9 酸沉 pH 值对烟叶蛋白提取率的影响
Fig. 9 Effect of depositing pH value with acid on protein extraction rate



(pH3.0, 常温静置)

图 10 酸沉静置时间对烟叶蛋白提取率的影响

Fig. 10 Effect of depositing time with acid on protein extraction rate

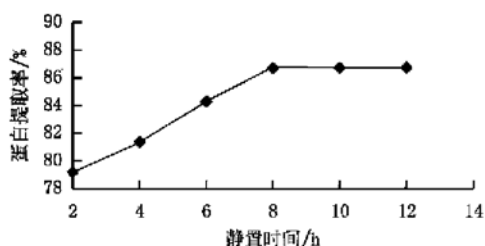
表 3 酸沉静置温度对烟叶蛋白提取率的影响
Table 3 Effect of depositing temperature with acid on protein extraction rate

静置温度/℃	4	25	37
蛋白酸沉提取率/%	79.19	77.46	73.34

注: pH3.0, 静置 2 h。

从图 9 可以看到, 当 pH 值为 3.0 时, 烟叶蛋白酸沉提取率达到最高为 77.46%, 可见烟叶蛋白在 pH3.0 时溶解度最小。图 10 表明, 静置 2 h 时, 烟叶蛋白能充分聚集絮凝沉淀, 再增加静置时间, 蛋白提取率几乎不变。表 3 显示, 低温下有助于烟叶蛋白的酸沉提取, 在 4℃ 下进行静置沉淀蛋白, 烟叶蛋白提取率比在 37℃ 下提高了 7.98%。原因可能是在低温下, 烟叶蛋白的溶解度更低, 更容易沉淀下来。

为了得到低温沉淀烟叶蛋白的最佳工艺参数, 因而对低温静置时间这单一因素进行了研究, 结果如图 11 所示。



(pH3.0, 静置温度 4℃)

图 11 低温下静置时间对烟叶蛋白提取率的影响

Fig. 11 Effect of depositing time with acid at 4℃ on protein extraction rate

图 11 表明, 烟叶蛋白酸沉提取率随静置时间的延长而提高, 低温静置 8 h, 烟叶蛋白能充分絮凝沉淀, 蛋白提取率达到最高为 86.71%。再延长静置时间, 蛋白提取率几乎没有变化, 因此, 低温静置时间以 8 h 为最佳。综上所述, 烟叶蛋白酸沉工艺中, 以 pH3.0, 4℃ 下静置 8 h 为最佳工艺参数。

2.4 烟叶蛋白氨基酸组成和含量分析

本文对所提取出的烟叶蛋白质进行了氨基酸分析, 结果如表 4 所示。

表 4 烟叶蛋白氨基酸组成与含量分析

Table 4 Amino acid analysis of protein from tobacco leaf $g \cdot (100 g)^{-1}$

类别	烟叶蛋白	FAO/WHO 模式谱 ^[16]
天门冬氨酸(Asp)	6.06	
谷氨酸(Glu)	9.86	
丝氨酸(Ser)	2.53	
甘氨酸(Gly)	2.59	
组氨酸(His)	1.49	
精氨酸(Arg)	4.96	
苏氨酸(Thr)	4.14	4.00
丙氨酸(Ala)	2.36	
脯氨酸(Pro)	3.75	
酪氨酸(Tyr)	1.76	Tyr+ Phe 合计 6.00
缬氨酸(Val)	2.90	5.00
蛋氨酸(Met)	0.57	Met+ Cys 合计 3.50
半胱氨酸(Cys)	2.00	
异亮氨酸(Ile)	3.09	4.00
亮氨酸(Leu)	3.81	7.00
色氨酸(Trp)	1.42	1.00
苯丙氨酸(Phe)	1.61	
赖氨酸(Lys)	3.29	5.50
氨基酸总量(T)	58.19	36.00
必需氨基酸总量(E)	24.59	

氨基酸分析结果表明, 烟叶蛋白中氨基酸组成比较丰富, 含有 18 种氨基酸, 其中包括 8 种人体所必需的氨基酸。其中谷氨酸、天门冬氨酸含量最高, 含量分别为 9.86% 和 6.06%, 而蛋氨酸含量最低, 仅为 0.57%。氨基酸总量为 58.19%, 其中必需氨基酸含量为 24.59%。根据氨基酸评分(AAS, 计算方法为 $E/36.00 \times 100$, 36.00 为 FAO/WHO 模式谱中必需氨基酸总含量), 烟叶蛋白的氨基酸分数(AAS)为 68.30, 远远高于玉米(AAS=49)和芝麻(AAS=50)^[16], 同时烟叶蛋白中必需氨基酸占其总量的比值(E/T)为 0.42, 达到了 FAO/WHO 提出的蛋白质中 E/T 比应在 0.40 以上的参考蛋白模式^[17], 由此可见烟叶蛋白是一类较优质的蛋白质资源。

3 讨论与结论

1) 中国大量的低次烟叶资源, 通过采用现代分离技术和食品生物技术, 可实现资源的充分综合利用, 服务于人类, 意义重大。烟叶蛋白提取工艺包括磨浆、碱溶和酸沉三个步骤。低次烟叶经磨浆后, 由于烟叶中大量氨基酸、有机酸、烟碱等物质的溶出, 从而使磨浆后烟叶混合液的 pH 值变化很大, 因此在碱溶操作过程中, 必须对其 pH 值再进行调整。选择氢氧化钾和磷酸调整 pH 值, 是因为残留于烟叶渣中的钾、磷元素能促进燃烧, 经提取蛋白后的烟叶渣可再次用于烟草薄片的生产, 从而有利于改善卷烟产品的质量和风格。

2) 烟叶蛋白提取工艺中, 磨浆工艺的最佳水平组合为固液比 1g 17, 提取液温度 60℃, 提取液 pH8.0, 在此条件下磨浆两次; 碱溶操作的最佳工艺是温度 60℃, pH8.0, 时间 60 min, 搅拌条件下碱溶提取 3 次; 烟叶蛋

白酸沉过程中,在 pH3.0, 4℃条件下静置 8 h 效果最佳,烟叶蛋白酸沉提取率最高为 86.71%。

3) 烟叶蛋白的氨基酸分析结果显示:其氨基酸种类齐全,必需氨基酸含量较高,氨基酸分数较高,表明烟叶蛋白是一类比较优质的蛋白质资源,应用前景广泛。

[参 考 文 献]

- [1] 曹 虎. 用烟草生产食用蛋白[J]. 中国烟草学报, 2000, 6(2): 14.
- [2] 《卷烟工艺》编写组. 卷烟工艺[M]. 北京: 北京出版社, 1993.
- [3] 詹金华, 陈志良. 烟草栽培[M]. 昆明: 云南科技出版社, 1998.
- [4] 郭培国, 李荣华, 陈建军. 烟叶中 FI 蛋白的简捷提取技术及其氨基酸成分分析[J]. 中国烟草学报, 2000, 6(2): 16.
- [5] Deepa B, Carol W, Kevin V C, et al. Tobacco protein separation by aqueous two-phase extraction[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 989: 119– 129.
- [6] Sridevi M K, Chakraborty M K. Extractable protein from tobacco and aspects of its nutritional quality[J]. Tob. Res., 1985, 11: 19– 28.
- [7] Kung S D, James A S, Tso T C, et al. Tobacco as a potential food source and smoke material: nutritional evaluation of tobacco leaf protein[J]. Journal of Food Science, 1980, 45: 320– 322.
- [8] Qingshun Li, Christopher B, Lawrence H, et al. A tridecapeptide possesses both antimicrobial and protease-inhibitory activities[J]. PEPTIDES, 2002, 23: 1– 6.
- [9] 张 恒. 几种粮食类植物蛋白分离方法[J]. 粮食科技与经济, 1997, (4): 40– 42.
- [10] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [11] 王丽华, 李元瑞, 陈 懿, 等. 姬松茸多糖脱蛋白方法的研究[J]. 食品科技, 2003, (1): 18– 20.
- [12] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [13] 苏拔贤. 生物化学制备技术[M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [14] 张淑茹, 程闰达. 蛋白饮料稳定性初探[J]. 食品工业科技, 1998, (2): 19– 21.
- [15] 沈 同, 王镜岩, 赵邦梯, 等. 生物化学(上册, 第2版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990.
- [16] 刘克武, 赵欣平, 刘晓雯, 等. 四川烤烟叶蛋白氨基酸分析及营养评价[J]. 烟草科技, 2000, 4: 20– 21.
- [17] FAO/WHO. Energy and protein requirement[R]. Report of Joint FAO/WHO, Geneva: WHO, 1973, 63.

Optimization of extraction technology and amino acid analysis of protein extracted from discarded tobacco leaf

Zhao Mouming, Rao Guohua, Lin Weifeng, Yang Xiaoquan

(College of Light Industry and Food, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In order to utilize efficiently protein resource in discarded tobacco leaf, the optimum technological conditions for extracting protein from discarded tobacco leaf by the method of dissolving with alkali and depositing with acid were investigated. Moreover, amino acid composition of the protein was analyzed by HPLC system. The results showed that optimum extracting conditions for tobacco leaf grinding were: the 1 : 17 ratio of tobacco leaf/water, 60℃, pH8.0 and twice grinding. Optimum extracting conditions for protein were: 60℃, pH8.0, 60 min and extracting for three times with agitation. Optimum conditions for acid depositing protein were: pH3.0, 4℃ for 8 h and the extraction rate reached 86.71% under the conditions. The obtained protein obtained contained relatively complete amino acid composition, and was rich in essential amino acids. In addition, higher amino acid score was found in the protein obtained according to the process mentioned above. It indicated that tobacco leaf protein was a kind of valuable resource.

Key words: discarded tobacco leaf; protein; extraction rate; amino acid