

# 低次烟叶蛋白质提取工艺研究

饶国华, 赵谋明, 林伟锋, 杨晓泉

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

**[摘要]** 以低次烟叶为材料,研究了烟叶蛋白质最佳提取工艺。采用 $L_{16}(3^4)$ 正交试验设计研究了烟叶磨浆工艺。结果表明,磨浆工艺的最佳工艺参数为固液比(烟叶:水)1:17,提取温度60℃,提取液pH 8.0,磨浆2次。采用响应曲面分析法研究了烟叶蛋白碱溶工艺,得到其最佳工艺参数为温度60℃,pH 8.0,时间60 min,搅拌条件下碱溶3次。烟叶蛋白酸沉操作中,在pH 3.0,4℃下静置8 h效果最佳,最终烟叶蛋白提取率为76.62%。

**[关键词]** 低次烟叶;蛋白质;响应面;提取率

**[中图分类号]** TS49

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2005)11-0067-06

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)是茄科烟草属植物<sup>[1,2]</sup>。烟叶中各成分含量非常复杂,其中蛋白质含量最为丰富,如白肋烟中蛋白质含量高达20.48%<sup>[3]</sup>。随着对植物叶蛋白研究的不断深入,人们逐渐认识到植物叶蛋白是世界上最丰富的蛋白资源之一,是解决当前世界人口日益膨胀问题的一种新的食物蛋白来源<sup>[4]</sup>。据报道<sup>[5~7]</sup>,植物叶蛋白中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物蛋白来源应用到食品领域。从食品和营养的角度分析,烟草蛋白的氨基酸组成和含量相当丰富、均衡,比鸡蛋、牛奶更具有营养价值,通过各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<sup>[8]</sup>。在烟草种植和加工过程中产生了大量的低次烟叶,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,既浪费了大量宝贵的资源,又污染了环境。

目前,有关烟叶蛋白资源综合利用的报道很少<sup>[1]</sup>,且都是以新鲜烟叶为原料,采用水浸提法或者专利技术提取烟叶蛋白质。本文以低次烟叶(晒烟)为原料,采用碱溶酸沉法提取蛋白质,研究其提取工艺,旨在为低次烟叶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 材料和主要设备

晒烟, B1K级, 广东产。取整片烟叶(去除叶梗、

叶脉)用MJ-176NR搅拌机打碎,备用。氢氧化钾、磷酸、三氯乙酸,均为分析纯。

PHS-3C型精密pH计(上海),MJ-176NR搅拌机(日本),胶体磨(温州),JB200-D型强力电动搅拌机(上海),CR22G高速冷冻离心机(日本),Buchi全自动凯氏定氮仪(瑞士)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 烟叶蛋白的提取 采用碱溶酸沉法<sup>[9]</sup>,其工艺流程如下:

烟叶→捣碎→加水→胶体磨磨浆→碱溶第1次→0.71 mm滤布过滤→再碱溶2次→离心(4 800 r/min, 20℃, 30 min)除杂→酸沉→离心(4 800 r/min, 4℃, 30 min)沉淀蛋白。

1.2.2 总氮的测定 采用常量凯氏定氮法<sup>[10]</sup>。

1.2.3 非蛋白氮(NPN)的测定 采用三氯乙酸法<sup>[11,12]</sup>。经测定,晒烟B1K级中蛋白质含量为8.05%。

1.2.4 响应面试验设计 根据预试验结果,碱溶工艺中影响烟叶蛋白提取率的3个主要因素分别为碱溶温度(℃)、pH值和碱溶时间(min)。利用RSM软件,采用Central Composite设计三因素三水平响应面分析试验,研究各因素对烟叶蛋白提取率的影响。试验中选取碱溶温度为50~70℃,pH值为7.0~9.0,碱溶时间为30~90 min,响应值为最终烟叶蛋白提取率,每个试验重复2次,取平均值。

设因变量响应值(y)受3个自变量碱溶温度

[收稿日期] 2005-03-28

[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] 饶国华(1976-),男,湖南宁乡人,在读博士,主要从事食品生物技术及烟叶资源综合利用研究。

( $x_1$ )、pH 值( $x_2$ )和碱溶时间( $x_3$ )的影响,并认为  $y$  与  $x_1, x_2, x_3$  关系符合二次方程数学模型:

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + a_{33}x_3^2 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3,$$

式中,  $a_n$  为方程的回归系数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 磨浆工艺研究

为了提高烟叶蛋白提取率,在提取蛋白之前,烟

叶必须进行磨浆处理,以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<sup>[14]</sup>。因此,对磨浆工艺中的固液比、提取温度、提取液 pH 值和磨浆次数分别进行试验,测定最终烟叶蛋白提取率,重复 3 次,确定其最佳工艺参数。试验结果如图 1、图 2、图 3、图 4 所示。

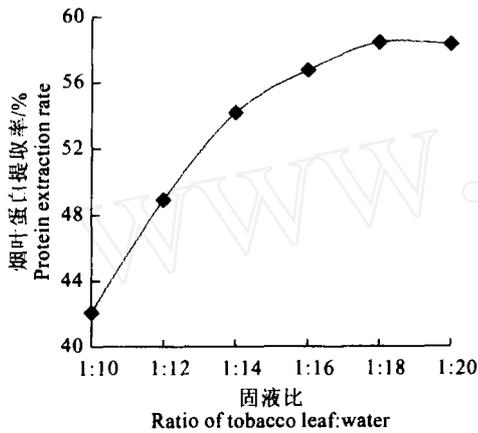


图1 固液比对烟叶蛋白提取率的影响  
(提取温度 50 ℃, 提取液 pH 值 7.0, 磨浆 2 次)  
Fig. 1 Effect of the ratio of tobacco leaf: water on protein extraction rate  
(50 ℃, pH 7.0, grinding for two times)

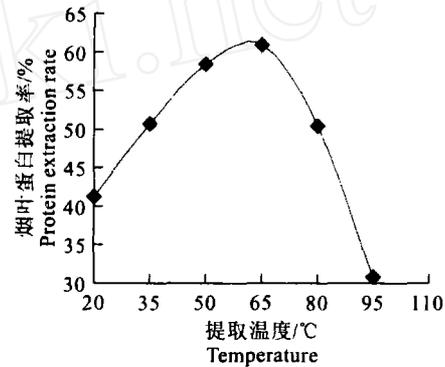


图2 提取温度对烟叶蛋白提取率的影响  
(固液比 1:18, 提取液 pH 7.0, 磨浆 2 次)  
Fig. 2 Effect of temperature on protein extraction rate  
(1(tobacco leaf):18(water), pH7.0, grinding for two times)

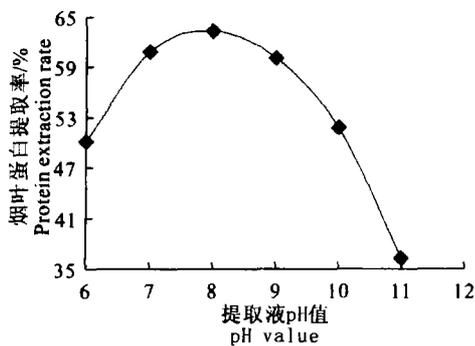


图3 提取液 pH 值对烟叶蛋白提取率的影响  
(固液比 1:18, 提取温度 65 ℃, 磨浆 2 次)  
Fig. 3 Effect of pH value on protein extraction rate  
(1(tobacco leaf):18(water), 65 ℃, grinding for two times)

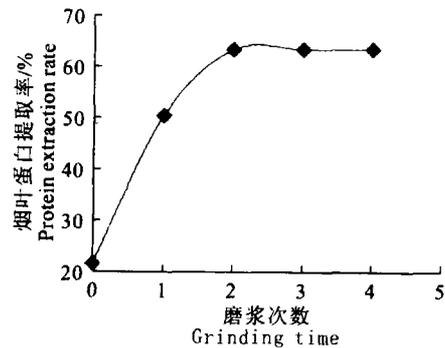


图4 磨浆次数对烟叶蛋白提取率的影响  
(固液比 1:18, 温度 65 ℃, pH 值 8.0)  
Fig. 4 Effect of grinding times on protein extraction rate  
(1(tobacco leaf):18(water), 65 ℃, pH 8.0)

从图 1 可以看出,烟叶蛋白提取率随固液比的增大而提高,当固液比为 1:18 时,烟叶蛋白提取率最高为 58.37%,再增大固液比,烟叶蛋白提取率变化不大。图 2 结果表明,烟叶蛋白提取率随提取温度的升高而增大,在 65 ℃ 时,烟叶蛋白提取率最高,为

60.82%。当提取温度进一步升高时,烟叶蛋白提取率反而下降。原因可能是温度过高时,有部分烟叶蛋白发生变性沉淀而被离心除去。图 3 结果显示,提取液 pH 值对烟叶蛋白提取率的影响比较明显。当提取液 pH 值从 6.0 上升至 8.0 时,烟叶蛋白提取率

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 pH 8.0 时,蛋白质的水化作用非常强,因而烟叶蛋白提取率最高<sup>[14]</sup>。图 4 结果表明,烟叶蛋白提取率随磨浆次数的增多明显上升,但磨浆 2 次后,再增加磨浆次数时,烟叶蛋白提取率上升的幅度趋于平

缓,这可能是由于增加磨浆次数已不能再减小烟叶颗粒的粒度,因而对烟叶蛋白提取率影响不大。

为了确定磨浆工艺中固液比、提取温度和提取液 pH 值 3 个因素的最佳工艺参数,按表 1 设置的因素和水平进行磨浆工艺正交试验,以最终烟叶蛋白提取率为测定指标,结果见表 1。

表 1 磨浆工艺正交试验设计  $L_9(3^3)$  与试验结果Table 1 Orthogonal experiment design methods  $L_9(3^3)$  and results

实验号 Sequence of experiment	固液比(A) Tobacco leaf : water	提取温度(B)/ C Temperature	提取液 pH 值(C) pH value	烟叶蛋白提取率/% Protein extrac- tion rate
1	1(1 : 17)	1(60)	1(7.5)	66.71
2	1	2(65)	2(8.0)	63.65
3	1	3(70)	3(8.5)	55.29
4	2(1 : 18)	1	2	67.28
5	2	2	3	61.62
6	2	3	1	54.13
7	3(1 : 19)	1	3	67.04
8	3	2	1	59.09
9	3	3	2	56.76
$K_1$	185.64	201.03	179.94	
$K_2$	183.03	184.35	187.68	
$K_3$	182.88	166.17	183.96	
$k_1$	61.88	67.01	59.98	
$k_2$	61.01	61.45	62.56	
$k_3$	60.96	55.39	61.32	
最优水平 Optimal level	$A_1$	$B_1$	$C_2$	
R	0.92	11.62	2.58	

表 1 结果表明,磨浆工艺的最优水平组合为  $A_1B_1C_2$ ,即固液比 1 : 17,提取温度 60 C,提取液 pH 值为 8.0,磨浆 2 次。影响烟叶蛋白提取率的因素显著(R 值)次序为:提取温度>提取液 pH 值>固液比。 $A_1B_1C_2$  组合在正交试验中并未出现,通过采用磨浆工艺最优水平参数进行试验,得到烟叶蛋白提取率为 67.46%,比表 1 中最高提取率 67.28% 还要高,这进一步验证了正交试验结果的准确性和可靠性。

## 2.2 碱溶工艺响应曲面法研究

在碱溶工艺中,碱溶温度、pH 值、碱溶时间和碱溶次数等直接影响烟叶蛋白的高效提取<sup>[15]</sup>。对碱溶温度、pH 值和时间采用响应曲面法研究,利用 RSM 软件设计试验,碱溶 4 次,结果如表 2 所示。对试验数据进行分析处理,计算出公式中的  $a_n$  值,并通过变量分析,检验方程中各系数是否显著,结果见表 3。从表 3 可以看出,y 的回归方程系数在 0.01 水平显著,说明试验设计的模型对响应值是显著的,回

归方程能正确反映碱溶工艺中各因素对烟叶蛋白提取率的影响。

由表 3 可知,碱溶温度和 pH 值对烟叶蛋白提取率均有较大影响,而碱溶时间的影响不大。根据二次回归方程,通过响应曲面分析法建立各因素与响应值之间的响应立体图,可以直观地反映局部参数值和整体响应值之间的交互对应关系,如图 5,图 6,图 7 所示。

由图 5 可知,碱溶温度和 pH 值均直接影响烟叶蛋白提取率。随着碱溶温度的上升,烟叶蛋白提取率先上升后下降;随着 pH 值的上升,烟叶蛋白提取率也是先上升后下降,在中心位置即 60 C, pH 为 8.00 时,烟叶蛋白提取率达到最高。从图 6 可以看出,烟叶蛋白提取率随碱溶温度的上升先上升后下降,但碱溶时间的延长对烟叶蛋白提取率贡献不大。图 7 结果表明,pH 值和碱溶时间对烟叶蛋白提取率影响的响应面呈中间高两边低的拱形,在 30~90 min,烟叶蛋白提取率随 pH 值的上升先升高后下

降,而碱溶时间对烟叶蛋白提取率的影响不大。

表 2 碱溶工艺响应面设计试验设计及结果

Table 2 Response surface methodology (RSM) design and results of extraction with alkali

设计点 Design point	碱溶温度 ( $x_1$ )/C Temperature	pH 值 ( $x_2$ ) pH value	碱溶时间 ( $x_3$ )/min Time	烟叶蛋白 提取率 ( $y$ )/% Protein extraction rate	设计点 Design point	碱溶温度 ( $x_1$ )/C Temperature	pH 值 ( $x_2$ ) pH value	碱溶时间 ( $x_3$ )/min Time	烟叶蛋白 提取率 ( $y$ )/% Protein extraction rate
1	60	8	60	67.46	11	60	7	60	57.38
2	70	8	60	52.84	12	60	8	60	67.45
3	70	7	30	42.39	13	50	7	30	51.52
4	70	7	90	43.16	14	50	8	60	58.41
5	60	8	30	63.87	15	60	8	60	67.37
6	60	8	60	67.38	16	50	9	90	56.81
7	60	8	60	67.33	17	70	9	90	18.17
8	50	9	30	55.05	18	50	7	90	53.24
9	70	9	30	48.03	19	60	9	60	60.20
10	60	8	90	67.59	20	60	8	60	67.11

表 3 碱溶工艺响应面设计试验设计的回归方程系数及显著性检验结果

Table 3 RSM design's coefficient of regression equation and results of significant test of extraction with alkali

回归系数 Regression coefficient	$a_0$	一次项 Linear			二次项 Quadratic			交互作用项 Interaction			F 值 F value	大于 F 的概率 Prob>F
		$a_1$	$a_2$	$a_3$	$a_1^2$	$a_2^2$	$a_3^2$	$a_{12}$	$a_{13}$	$a_{23}$		
响应值 y(烟叶蛋白提取率) Response value	66.78	-1.05*	2.06**	0.81	-10.16***	7.01**	0.067	0.44	-0.32	-0.071	91.06	0.0001

注: \* 表示在 5% 显著; \*\* 表示在 1% 显著。

Note: \* Indicated significance at level of  $P < 5\%$  and \*\* indicated significance at level of  $P < 1\%$ .

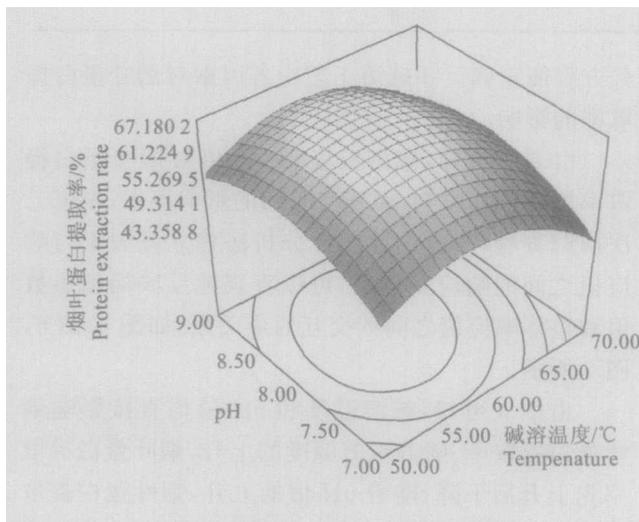


图 5 碱溶温度和 pH 值对烟叶蛋白提取率的影响

Fig. 5 Effect of temperature and pH value on protein extraction rate

利用 RSM 软件对试验结果进行优化,可得到烟叶蛋白碱溶的最佳工艺参数:碱溶温度 59.71 C、pH 值 8.06、碱溶时间 85.86 min,烟叶蛋白提取率理论值可达 67.63%。

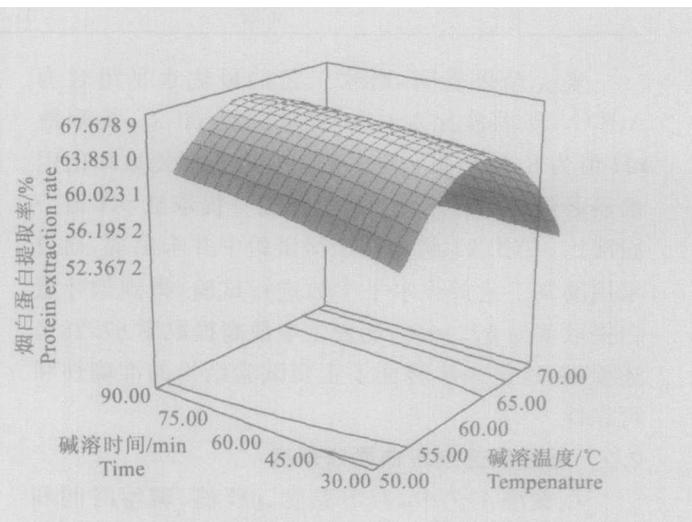


图 6 碱溶温度和时间对烟叶蛋白提取率的影响

Fig. 6 Effect of temperature and time on protein extraction rate

为了检验 RSM 分析的可靠性,采用上述最优工艺条件进行验证试验,同时考虑到便于实际操作,将其最佳工艺条件修正为碱溶温度 60 C、pH 值 8.10、碱溶时间 86.00 min,重复 3 次取平均值,结

果表明烟叶蛋白提取率为 67.48%，验证试验结果与理论预测值误差在 0.10% 以内，表明优化工艺参数的可靠性。而表 2 中，在碱溶温度 60 C，pH 值 8.0，碱溶时间 60.00 min 条件下重复试验，蛋白提取率可达到 67.46%，与优化条件下的蛋白提取率相差不多，同时考虑到操作的方便性与经济性，所以以

温度 60 C，pH 值 8.00，碱溶时间 60.00 min 作为碱溶操作的工艺参数。图 8 结果表明，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，烟叶蛋白提取率几乎没有变化。因此，烟叶蛋白碱溶操作的最佳工艺条件为：碱溶温度 60 C，pH 值 8.00，碱溶时间 60 min，搅拌条件下碱溶 3 次。

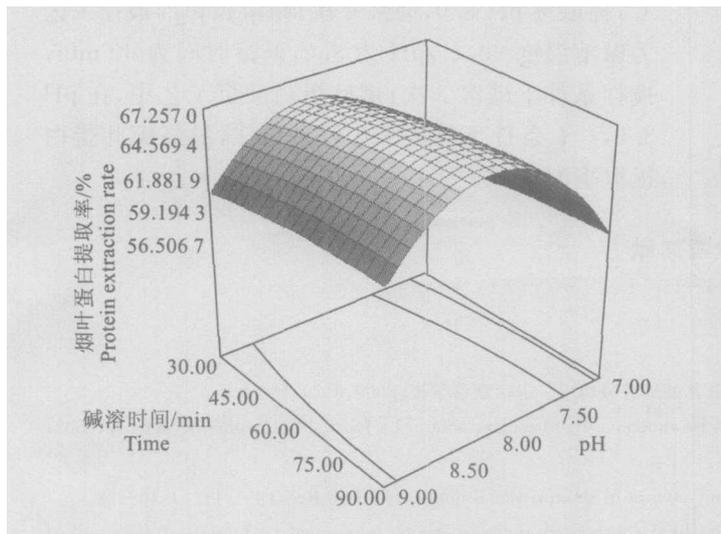


图 7 pH 值和碱溶时间对烟叶蛋白提取率的影响

Fig. 7 Effect of pH value and time on protein extraction rate

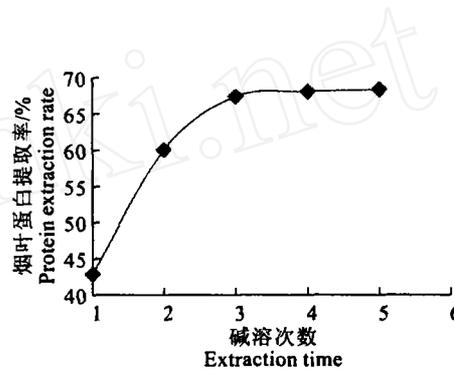


图 8 碱溶次数对烟叶蛋白提取率的影响

Fig. 8 Effect of extraction time on protein extraction rate

### 2.3 酸沉工艺研究

烟叶蛋白酸沉工艺中，烟叶蛋白提取率与酸沉的 pH 值、静置温度和静置时间直接相关<sup>[15]</sup>。从图 9 可以看出，当 pH 为 3.0 时，烟叶蛋白提取率达到最高，为 67.46%，可见烟叶蛋白在 pH 3.0 时溶解度最小。表 4 结果显示，低温有助于烟叶蛋白的沉淀提取，在 4 C 下静置沉淀蛋白，烟叶蛋白提取率较在

37 C 下提高了 9.24%。原因可能是在低温下，烟叶蛋白的溶解度更低，更容易絮凝沉淀。图 10 结果表明，烟叶蛋白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 76.62%。再延长静置时间，烟叶蛋白提取率几乎没有变化。综上所述，烟叶蛋白酸沉工艺的最佳工艺参数为 pH 3.0，4 C 下静置 8 h。

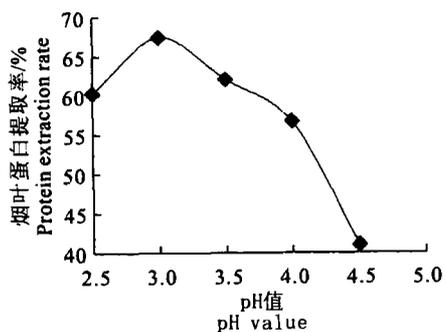


图 9 酸沉 pH 值对烟叶蛋白提取率的影响  
25 C，静置 2 h

Fig. 9 Effect of pH value on protein extraction rate  
25 C，2 h

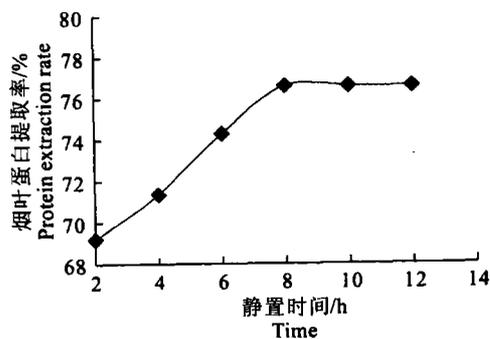


图 10 低温下静置时间对烟叶蛋白提取率的影响  
pH 3.0，静置温度 4 C

Fig. 10 Effect of time on protein extraction rate  
pH 3.0，4 C

表 4 酸沉静置温度对烟叶蛋白提取率的影响  
Table 4 Effect of depositing temperature with acid on protein extraction rate

静置温度/℃ Temperature	烟叶蛋白提取率/% Protein extraction rate
4	69.19
25	67.46
37	63.34

注:pH 3.0,静置 2 h。Note:pH 3.0,time for 2 h.

### 3 结 论

(1) 研究表明,烟叶中蛋白质含量非常丰富,可

溶性蛋白质含量较高,通过碱溶酸沉法可以将其提取出来,作为一种新的食物蛋白来源,通过适当加工处理可应用到食品领域中,变废为宝,以实现资源的充分综合利用。

(2) 烟叶蛋白提取工艺研究结果表明:磨浆工艺的最佳水平组合为固液比 1:17,提取温度 60℃,提取液 pH 8.0,磨浆 2 次;碱溶操作的最佳工艺为碱溶温度 60℃,pH 为 8.0,碱溶时间为 60 min,搅拌条件下碱溶 3 次;烟叶蛋白酸沉工艺中,在 pH 3.0,4℃条件下静置 8 h 效果最佳,最终烟叶蛋白提取率为 76.62%。

#### [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): 14-15.
- [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 F1 蛋白的简便提取技术及其氨基酸成分分析[J]. 中国烟草学报, 2000, 6(2): 16-20.
- [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, Chakraborty M K. Extractable protein from tobacco and aspects of its nutritional quality[J]. Tob Res, 1985, 11(1): 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] Li Qingshun, Lawrence C B, Davies H M, 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, 赵邦伟, 等. 生物化学(上册)[M]. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1990.

## Study on protein extraction technology from discarded tobacco leaf

RAO Guo-hua, ZHAO Mou-ming, LIN Wei-feng, YANG Xiao-quan

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

**Abstract:** The optimum extracting conditions of protein in discarded tobacco leaf was studied. The results showed that the optimum technology conditions for tobacco leaf grinding were as follows: the ratio of 1 (tobacco leaf) : 17 (water), temperature 60℃, pH 8.0 and grinding twice with orthogonal experiment design methods  $L_9(3^4)$ . The optimum extracting conditions of protein were 60℃, pH 8.0, 60 min and extracting three times with agitation by Response Surface Methodology. And the optimum conditions of depositing protein with acid were pH 3.0, 4℃ for 8 h. The extraction rate reached 76.62% under the optimal conditions.

**Key words:** discarded tobacco leaf; protein; response surface methodology; extraction percent