

再造烟叶浓白水中蛋白质提取工艺的优化研究

卫青, 吴平艳, 段孟, 张振强, 刘维涓* (云南瑞升烟草技术(集团)有限公司, 云南昆明 650106)

摘要 [目的]研究薄片厂抄造段浓白水中蛋白质回收工艺,减少废水中有机物对环境造成的污染,促进环境与经济可持续发展。[方法]分析 pH 对提取再造烟叶浓白水中可溶性蛋白质的影响,确定适宜工艺参数。[结果]从再造烟叶浓白水中提取可溶性蛋白质的最佳工艺参数为酸溶 pH 3.5,碱沉 pH 8.0。[结论]选取适宜的 pH 可对高效提取浓白水中蛋白质起到决定性作用。

关键词 再造烟叶;抄造段;浓白水;提取;蛋白质

中图分类号 S572 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)30-0067-03

Optimization of Protein Extraction Technology of Concentrated White Water of Reconstituted Tobacco

WEI Qing, WU Ping-yan, DUAN Meng, LIU Wei-juan* et al (Yunnan Reascend Tobacco Technology (Group) Co., Ltd., Kunming, Yunnan 650106)

Abstract [Objective] To research the protein extraction technology in concentrated white water in chip factory, and to alleviate the environmental pollution caused by organic compounds, and to promote sustainable environment and economic development. [Method] Effects of pH value on soluble protein in concentrated white water were researched. [Result] The optimal technology parameter for extracted soluble protein was as follows: acid extraction pH 3.5, alkali precipitation pH 8.0. [Conclusion] A suitable pH value plays a decisive role in efficient protein extraction of concentrated white water.

Key words Reconstituted tobacco; Papermaking; Concentrated white water; Extraction; Protein

造纸法再造烟叶生产过程中耗水量很大,据统计,每生产 1 t 再造烟叶产品产生废水量在 70 m³ 以上。因其具有色度高、成分杂、降解难的特点,会对周边环境造成严重危害^[1-3]。莫立焕等率先对造纸法烟草薄片产生的废水进行了深度研究,发现废水中含有木质素、纤维素、果胶、多糖、可溶性蛋白质等有机物^[4],其中蛋白质的含量最为丰富。研究表明,烟草中蛋白质含有各种氨基酸,其含量极其丰富、均衡,经精密加工可获得生物活性肽、氨基酸等附加值高的产品^[5-6]。如果能够将再造烟叶废水中高价成分——蛋白质进行回收利用,不仅有助于保护自然环境,减少资源浪费,更重要的是目前动物蛋白生产供应不足,无法满足人们的需求,回收利用优质植物蛋白很可能是一条可行的解决途径。

迄今为止有关造纸法再造烟叶废水方面的研究,均围绕废水净化处理开展工作^[7-8],有关烟草蛋白提取方面的研究,均是以残次烟叶为原料进行的,并且提取过程繁琐,难以实现规模化生产^[9-10]。笔者选取再造烟叶抄造型网布下的浓白水作为研究对象,提取其中烟草蛋白,以减少生产废水中有机物对环境造成的污染,促进薄片行业环境与经济的可持续发展。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料及主要试剂。白水,由云南某薄片厂提供;NaOH,西陇化工股份有限公司;H₃PO₄,分析纯,西陇化工股份有限公司。

1.1.2 主要仪器。SHZ-D(III)型循环式真空泵,巩义市予华仪器有限责任公司;PHS-3C 型精密 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;centrifuge 5804R 型离心机, Eppendorf;

LC-162型冰箱,海尔;MS 204S 型电子天平,Switzerland。

1.2 方法

1.2.1 烟草蛋白质沉淀。用磷酸将白水调至 pH 约 3.0,静置一段时间。使用 NaOH 调节溶液至 pH 约 8.0,在 4 ℃ 环境下静置 3.0 h。若产生沉淀,将沉淀离心分离,对沉淀成分进行检测。

1.2.2 烟草蛋白质沉淀的最佳 pH。将白水分成 5 份,用磷酸分别调 pH 为 2.5、3.0、3.5、4.0、5.0,静置一段时间,使用 NaOH 调节溶液 pH 约 8.0,在 4 ℃ 环境下静置 3.0 h,将沉淀离心分离,分别称量出沉淀物的重量。不同 pH 白水样品各设 6 次重复。

将白水分成 5 份,用磷酸将其均调至 pH 约 3.0,静置一段时间,使用 NaOH 调节溶液 pH 分别为 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0,在 4 ℃ 下静置 3.0 h,将沉淀离心分离,分别称量出沉淀物的重量。不同 pH 白水样品各设 6 次重复。

2 结果与分析

2.1 烟草蛋白质的沉淀 将试验得到的白色沉淀物送至云南同创检测技术股份有限公司进行成分检测,得到沉淀主要成分为蛋白质。由此表明,试验从烟草浆料中成功提取到了蛋白质(沉淀为水溶性蛋白质)。试验提取得到的烟草蛋白质沉淀量是否会随 pH 变化而变化,需要对不同 pH 下的试验结果进行分析。

2.2 白水中蛋白质提取的最佳 pH

2.2.1 酸溶最佳 pH。酸溶的最佳 pH 测定结果如表 1 所示。蛋白质沉淀质量随不同 pH 酸溶的变化趋势如图 1 所示。从表 1、图 1 可以看出,随酸溶 pH 的变化,沉淀质量随之变化,这是由于不同的 pH 酸溶程度不同,因此蛋白质沉淀溶解量不同(图 2)。当 pH 达到 3.5 时,沉淀质量为 3.252 3 g,达到最大值,比沉淀最低值 3.200 6 g 高出 1.6%;当 pH 为 4.0、5.0 时,由于蛋白质酸溶并不彻底,导致沉淀质量随 pH 的增大而减少,其变化趋势如图 1 所示。

作者简介 卫青(1979-),男,云南石屏人,高级工程师,硕士,从事再造烟叶技术研究。*通讯作者,研究员,博士,从事再造烟叶技术研究及产品开发、推广、应用。

收稿日期 2016-09-09

表1 各样品不同酸溶 pH 下的蛋白质沉淀质量

Table 1 Protein precipitation quantity under different acidic pH conditions

样品重复 Sample repetition	pH 2.5			pH 3.0			pH 3.5		
	离心前 Before precipitation	离心后 After precipitation	沉淀质量 Precipitation quantity	离心前 Before precipitation	离心后 After precipitation	沉淀质量 Precipitation quantity	离心前 Before precipitation	离心后 After precipitation	沉淀质量 Precipitation quantity
	1	7.280 3	7.841 4	0.561 1	7.161 2	7.521 1	0.359 9	7.105 4	7.724 6
2	7.236 0	7.747 0	0.511 0	7.165 3	7.638 0	0.472 7	7.239 7	7.589 9	0.350 2
3	7.250 6	7.786 7	0.536 1	7.263 2	7.831 3	0.568 1	6.993 8	7.658 7	0.664 9
4	7.119 2	7.746 7	0.627 5	7.187 9	7.776 8	0.588 9	7.227 1	7.819 4	0.592 3
5	7.139 9	7.629 7	0.489 8	7.245 8	7.802 3	0.556 5	7.224 6	7.583 8	0.359 2
6	7.257 1	7.782 0	0.524 9	7.024 3	7.678 8	0.654 5	7.149 6	7.816 1	0.666 5
沉淀总量 Total precipitation			3.250 4			3.200 6			3.252 3

样品重复 Sample repetition	pH 4.0			pH 5.0		
	离心前 Before precipitation	离心后 After precipitation	沉淀质量 Precipitation quantity	离心前 Before precipitation	离心后 After precipitation	沉淀质量 Precipitation quantity
	1	7.003 1	7.554 6	0.551 5	6.993 3	7.528 3
2	6.977 1	7.499 9	0.522 8	7.143 7	7.745 8	0.602 1
3	7.132 7	7.737 9	0.605 2	7.129 5	7.449 4	0.319 9
4	7.151 4	7.730 6	0.579 2	7.005 7	7.518 5	0.512 8
5	7.233 2	7.740 2	0.507 0	7.004 5	7.618 7	0.614 2
6	7.132 2	7.594 5	0.462 3	6.898 0	7.517 6	0.619 6
沉淀总量 Total precipitation			3.228 0			3.203 6

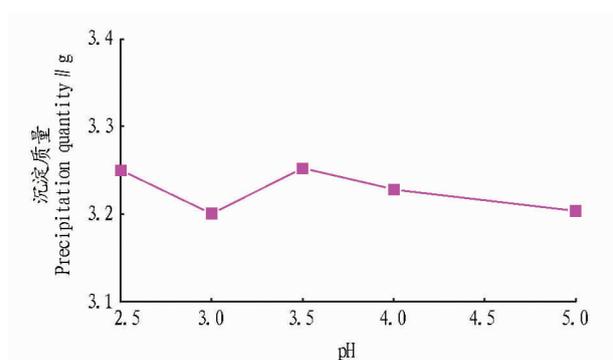


图1 蛋白质沉淀质量随不同酸溶 pH 的变化趋势

Fig. 1 Changing trend of the protein precipitation quantity with acidic pH



图2 不同 pH 酸溶的蛋白质沉淀

Fig. 2 The protein precipitation of different acidic pH

根据方差分析结果得知, $F > F_{-crit} = 5.317 655$, $P < 0.01$, 表明模型达到极显著, 酸溶的 pH 对蛋白质沉淀量具有极显著的影响, 烟草蛋白的沉淀量随 pH 的降低而增大, 直至

达到沉淀量的最大值。

利用回归分析, 对酸溶 pH 与烟草蛋白沉淀量的关系进行分析, 并对回归方程进行预估, 取 R^2 最大的方程, 得到回归方程为 $y = 0.128 3x^4 - 1.904 5x^3 + 10.383x^2 - 24.642x + 24.705$, R^2 值为 1 (拟合度很高), 预估拟合曲线如图 3 所示。可以看出, 酸溶 pH 与烟草蛋白沉淀量呈显著负相关。

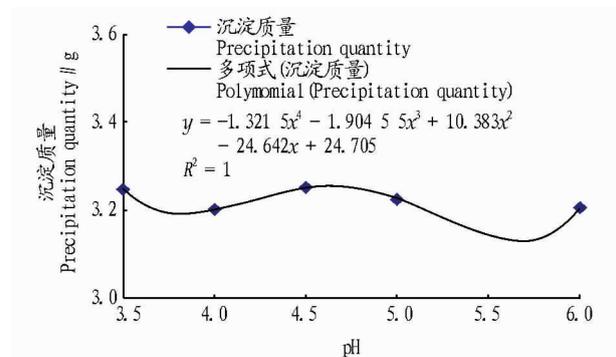


图3 酸性条件下烟草蛋白沉淀量的拟合曲线

Fig. 3 Fitting curve of tobacco protein precipitation quantity under acidic condition

2.2.2 碱沉最佳 pH。 碱沉的最佳 pH 测定结果, 参见表 2 所示。蛋白质的沉淀随不同 pH 碱沉的变化趋势如图 4 所示。由表 2、图 4 可以看出, 不同 pH 碱沉后的蛋白质沉淀量不同, 这是由于 pH 不同, 导致碱沉的程度不同 (图 5), 如 pH 为 7.0 时, 碱沉并不彻底, 蛋白质沉淀量少。当 pH 达到 8.0 时, 沉淀物达到最大值为 2.326 3 g, 比 pH 为 7.0 对应的沉淀量 1.564 8 g 高出 48.66%; 而 pH 小于 8.0 时, 由于碱沉不彻底, 沉淀量随 pH 减小而减少, 其变化趋势如图 4 所示。

表 2 各样品不同 pH 碱沉下的蛋白质沉淀质量

Table 2 Protein precipitation quantity of different alkaline pH values in different samples

样品重复 Sample repetition	pH 7.0			pH 7.5			pH 8.0			g
	离心前 Before precipitation	离心后 After precipitation	沉淀质量 Precipitation quantity	离心前 Before precipitation	离心后 After precipitation	沉淀质量 Precipitation quantity	离心前 Before precipitation	离心后 After precipitation	沉淀质量 Precipitation quantity	
	1	7.133 5	7.423 9	0.290 4	7.005 1	7.353 5	0.348 4	7.309 0	7.904 6	
2	7.064 3	7.264 9	0.200 6	7.151 8	7.386 3	0.234 5	7.347 4	7.959 6	0.612 2	
3	6.897 7	7.120 6	0.222 9	7.128 8	7.337 6	0.208 8	7.194 6	7.341 5	0.146 9	
4	7.132 2	7.409 2	0.277 0	7.143 0	7.521 2	0.378 2	7.085 8	7.533 5	0.447 7	
5	7.024 8	7.275 1	0.250 3	7.005 9	7.461 8	0.455 9	7.253 3	7.339 6	0.086 3	
6	6.994 3	7.317 9	0.323 6	7.150 6	7.546 3	0.395 7	6.954 9	7.392 5	0.437 6	
沉淀总量 Total precipitation			1.564 8			2.021 5			2.326 3	

样品重复 Sample repetition	pH 8.5			pH 9.0		
	离心前 Before precipitation	离心后 After precipitation	沉淀质量 Precipitation quantity	离心前 Before precipitation	离心后 After precipitation	沉淀质量 Precipitation quantity
	1	7.247 2	7.763 6	0.516 4	7.159 9	7.421 0
2	7.135 6	7.515 5	0.379 9	7.449 1	7.946 5	0.497 4
3	7.115 4	7.319 7	0.204 3	7.446 0	7.970 6	0.524 6
4	7.264 1	7.706 5	0.442 4	7.127 4	7.575 3	0.447 9
5	7.262 0	7.678 9	0.416 9	7.238 1	7.395 6	0.157 5
6	7.294 7	7.659 3	0.364 6	7.164 9	7.605 1	0.440 2
沉淀总量 Total precipitation			2.324 5			2.328 7

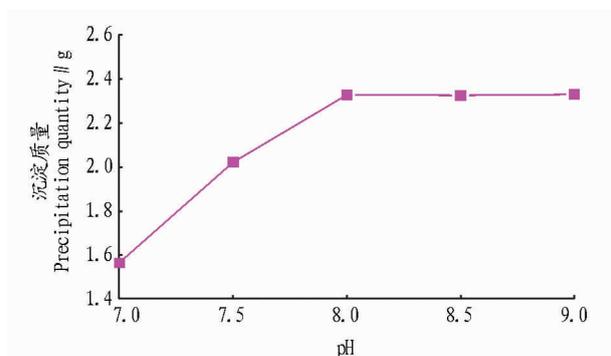


图 4 蛋白质沉淀质量随不同碱沉 pH 的变化趋势

Fig. 4 The changing trend of the protein precipitation quality with alkaline pH



图 5 不同 pH 碱沉的蛋白质沉淀

Fig. 5 The protein precipitation of different alkaline pH

根据方差分析结果得知, $F > F\text{-crit} = 5.317\ 655$, $P < 0.01$, 表明模型达到极显著, 碱沉的 pH 对蛋白质沉淀量具有极显著的影响, 沉淀量随 pH 增大而增加, 直至达到沉淀量的

最大值。

利用回归分析, 对碱沉 pH 与烟草蛋白质沉淀量的关系进行分析, 并对回归方程进行预估, 取 R^2 最大的方程, 得到回归方程为 $y = -0.346\ 2x^2 + 5.904\ 9x - 22.798$, R^2 值为 0.987 4 (拟合度很高), 预估拟合曲线如图 6。可以得出, 碱沉 pH 与烟草蛋白沉淀量呈显著正相关。

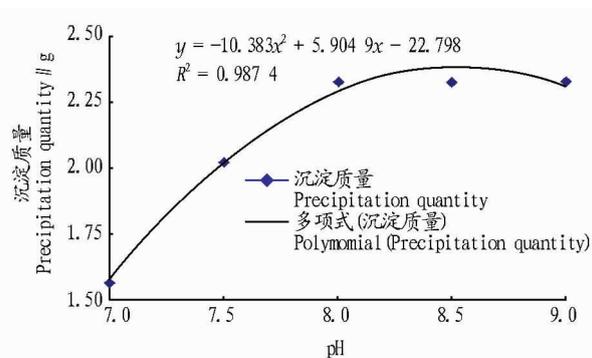


图 6 碱性条件下烟草蛋白质沉淀量的拟合曲线

Fig. 6 The fitting curve of tobacco protein precipitation quantity under alkaline condition

3 结论与讨论

早期研究表明^[11-12], 烟草中的蛋白质分为可溶性蛋白和不溶性蛋白。可溶性蛋白的 1/2 左右是叶绿体蛋白 (Fraction I protein, FI 蛋白), 另外 1/2 为其他可溶性蛋白质的复合物 (Fraction II protein, FII 蛋白)。FI 蛋白 (Rubisco 蛋白) 只溶解于底物 1,5-二磷酸核酮糖 (RuBP) 或高浓度盐 (如 NaCl) 溶液中; FII 蛋白因其为混合物, 不能结晶, 但可以被丙酮萃取和水洗提纯, 不含色素和酚类等杂质的性质。依据两者不同的理化性质及白色沉淀物性状, 可推断薄片生产过程中的 (下转第 89 页)

的淡紫拟青霉培养物处理番茄根结线虫病土,不仅能很好地促进番茄生长,还能显著提高淡紫拟青霉的防治效果。该研究也证实了万寿菊属植物孔雀草与淡紫拟青霉协同作用防治根结线虫效果好于单用,但该研究利用的不是孔雀草的叶子,所以孔雀草与淡紫拟青霉之间的协同增效机制还有待进一步研究。

土壤对不同微生物均普遍存在着抑菌作用,是影响生防菌剂防治效果的一个重要因素^[9]。刘佳斌等^[10-11]研究发现万寿菊根部提取物对西瓜枯萎病和辣椒枯萎病原菌的菌丝均具有较好的抑制效果。笔者认为孔雀草与淡紫拟青霉联合使用能显著提高淡紫拟青霉对根结线虫防治效果的稳定性,这可能是因为孔雀草的根系分泌物通过抑制其他微生物的生长,解除了淡紫拟青霉在土壤中定殖的部分土壤抑菌作用,为淡紫拟青霉的占位提供了有利条件。孔雀草与淡紫拟青霉间的协同增效机制还可能与孔雀草的根系分泌物对淡紫拟青霉生防因子的促进作用有关,Kerry等^[12]认为衡量一株生防真菌生防潜质的重要标准包括菌株的产孢能力、对线虫卵的侵染能力以及菌株的定殖能力。杨秀娟等^[5]研究发现,万寿菊叶的水提液不仅能促进淡紫拟青霉孢子的萌发,而且经0.01 mg/mL万寿菊叶水提液加淡紫拟青霉孢子混合处理的番茄根结线虫卵囊,12 d后线虫卵的孵化率仅为1.23%。因此,要了解孔雀草与淡紫拟青霉之间的增效协同作用,必须从孔雀草的根系分泌物入手。后续试验将进一步

(上接第69页)

程中的浓白水含有的烟草蛋白应归为FII蛋白。该试验表明,可通过酸碱工艺从白水中提取出可溶性蛋白质,进行烟草蛋白的回收利用。当碱沉pH一定,酸溶pH > 3.5时,烟草蛋白沉淀量随着酸溶pH的减小而增大;当酸溶pH一定,碱沉pH < 8.0时,烟草蛋白沉淀量会随碱沉pH的增大而增大;在pH 3.5时进行酸溶,同时,pH 8.0时进行碱沉,烟草蛋白质沉淀量最大。中性偏碱可获得蛋白质质量最大,这一结果同Platis等试验结论一致。中性偏碱的环境下,蛋白质提取率较高,这可能与烟草蛋白的等电点pI > 7有关^[13]。

总之,烟草蛋白是一种极具利用潜力和发展前景的植物蛋白资源,深入研究开发这种资源不仅有助于提高烟草的综合利用价值,还可促进烟草行业的可持续发展。尤其对于造纸法再造烟叶生产企业而言,由生产废水中提取烟草蛋白既保护了自然环境,减轻了对周边环境的污染,又可促进产业结构调整,增加企业收入,有较好的应用前景。

参考文献

[1] 陈祖刚,蔡冰,王建新,等. 国内外造纸法薄片工艺与品质比较[J]. 烟草科技,2002(2):4-10.

探讨孔雀草的根系分泌物对淡紫拟青霉的产孢能力、对线虫卵的侵染能力以及菌株定殖能力的影响,为两者联合使用对根结线虫的增效协同作用在烤烟根结线虫防治上的应用(使用时间、使用方法、使用量)提供指导。

参考文献

- [1] 谷希树,白义川,胡学雄,等. 蔬菜根结线虫病的发生与防治[J]. 农家之友,2003(3):32-33.
- [2] 谷端银,王秀峰,魏琨,等. 设施蔬菜根结线虫病发生严重的原因探讨[J]. 中国农学通报,2005,21(8):333-335.
- [3] 徐汉虹. 杀虫植物与植物性杀虫剂[M]. 北京:中国农业出版社,2001:333-344.
- [4] 金桂梅,胡小东,杨艳鲜,等. 生态调控技术防治烟草根结线虫试验[J]. 云南农业科技,2013(5):11-12.
- [5] 杨秀娟,何玉仙,陈庆河,等. 淡紫拟青霉适生性及其与2种植物协同作用防治根结线虫[J]. 福建农林大学学报(自然科学版),2005,34(3):290-293.
- [6] 薛超群,牟文君,奚家勤,等. 烤烟不同间作对烟草黑胥病防控效果的影响[J]. 中国烟草科学,2015(3):77-79.
- [7] 宋辉,亚平,王明文,等. 烟草根结线虫病防治药剂的筛选研究[J]. 云南农业大学学报,2011,26(6):740-748.
- [8] 唐启义,冯明光. 实用计算机统计分析及其计算机处理平台[M]. 北京:中国农业出版社,1997.
- [9] 祝明亮,张克勤. 淡紫拟青霉 IPC 土壤抑菌作用影响因子分析[J]. 云南大学学报(自然科学版),2006,28(6):533-538.
- [10] 刘佳斌,苏炜,王金胜. 万寿菊根部生物碱类提取物抑菌活性成分的研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(3):746-747.
- [11] 王文斌,郭春绒. 万寿菊根不同溶剂提取物对辣椒枯萎病菌的抑制作用[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2004,24(4):407-410.
- [12] KERRY B R, GRUMP D H. Observation on fungal parasites of females and eggs of the cereal cyst-nematodes, *Heterodera avenae*, and other cyst nematodes[J]. Nematological, 2011, 23(2):193-201.

- [2] 韩卿,张美云,吴养育,等. 造纸法烟草薄片制造工艺的研究[J]. 西北轻工业学院学报,2002,20(1):19-22.
- [3] 陈赛艳,李友明,雷利荣. 造纸法再造烟叶废水的臭氧氧化法预处理[J]. 烟草化学,2014(12):27-31.
- [4] 莫立焕,周志明,王玉峰. 造纸法烟草薄片废水深度处理研究[J]. 中国造纸,2012,31(10):37-40.
- [5] LI Q S, LAWRENCE C B, DAVIES H M, et al. A tridecapeptide possesses both antimicrobial and protease-inhibitory activities[J]. Peptides, 2002, 23(1):1-6.
- [6] 侯轶,李友明,郑振山. 造纸法烟草薄片废水中污染物的分析[J]. 华南理工大学学报(自然科学版),2008,36(3):95-98.
- [7] 邱晔,胡群,陈辉敏,等. 再造烟叶生产废水处理研究[J]. 工业水处理,2006,26(3):23-25.
- [8] 陈元彩,陈竹,肖仙英,等. 造纸法烟草薄片废水的研究[J]. 中国造纸,2006,25(9):20-22.
- [9] LOWE R H. Crystallization of Fraction I protein from tobacco by a simplified procedure[J]. FEBS Letters, 1977, 78(1):98-100.
- [10] CHAN P H, SAKANO K, SINGH S, et al. Crystalline Fraction I protein: Preparation in large yield[J]. Science, 1972, 176(4039):1145-1146.
- [11] KAWASHIMA N, WILDMAN S G. Fraction I protein[J]. Ann Rev Plant Physiol, 1970, 21:325-358.
- [12] 陈明达,丁玉,鞠明里,等. 烟草蛋白研究进展[J]. 河北农业科学, 2009, 13(6):50-52.
- [13] PLATIS D, LABROU N E. Development of all aqueous two-phase partitioning system for fractionating therapeutic proteins from tobacco extract[J]. Journal of chromatography A, 2006, 1128(1/2):114-124.