

烟草中蛋白质超滤提取工艺研究

魏赫楠^{1,2}, 谭红², 朱平², 董二慧^{1,2}, 李青^{1,2}, 何锦林²

(1. 贵州大学 化学与化工学院, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵州省分析测试研究院, 贵州 贵阳 550002)

摘要: 为研究超滤技术提取烟草中蛋白质的工艺, 以渗透通量和蛋白质截留率为综合目标, 系统讨论了操作压强、料液温度、料液 pH 值对烟草蛋白质提取率的影响。结果表明, 在本试验条件下, 超滤膜法提取烟草中蛋白质的最佳操作条件为操作压强 0.10 MPa、料液温度 22 ℃、pH 值 5.0。此条件下超滤提取烟草蛋白质的截留率最高可达 85.20%。

关键词: 超滤; 提取; 烟草; 蛋白质

中图分类号: TS41.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)11-0154-04

The Protein Extraction in Tobacco with Ultrafiltration

WEI He-nan^{1,2}, TAN Hong², ZHU Ping², DONG Er-hui^{1,2}, LI Qing^{1,2}, HE Jin-lin²

(1. College of Chemical Engineering and Chemistry, Guizhou University, Guiyang 550002, China;

2. Guizhou Academy of Testing and Analysis, Guiyang 550002, China)

Abstract: The investigation of ultrafiltration for extracting protein from tobacco was performed in this paper. With permeate flux and protein retention as target, this study discussed the effect of the system pressure, feed temperature, feed liquid pH on the extraction rate of tobacco protein. In this experiment, the optimal condition to extract protein in tobacco was as follows: pressure 0.10 MPa, feed temperature 22 ℃ and pH 5.0. The retention rate of tobacco protein was up to 85.20% under the optimal condition, providing a reliable theoretical basis for the industrial production.

Key words: ultrafiltration; extraction; tobacco; protein

随着对叶蛋白质研究的不断深入, 人们逐渐认识到植物叶蛋白是世界上最丰富的蛋白质资源, 是解决当前世界人口日益膨胀问题的一个新的食物蛋白来源^[1]。研究表明, 烟草蛋白质与其他蛋白质相比具有较高的营养价值和药用价值^[2], 而在烟叶的众多成分中, 也以蛋白质的含量最为丰富^[3]。因此, 提取烟草中的蛋白质将成为今后的研究热点之一。

超滤技术提取蛋白质是通过超滤膜表面的微孔结构对物质进行选择分离。超滤膜法具有无相变、能耗低、工艺设备简单、操作方便可靠、分离效果好且不会造成环境污染等优点, 在食品工业包括乳制品^[4]、蔬菜^[5-8]、棉籽^[9]等的蛋白质提取中广泛应用, 但在烟草蛋白质提取中还少有报道。鉴于此, 探讨了利用超滤技术提取烟草中蛋白质的工艺, 为烟

草中蛋白质的工业生产提供技术依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料及试剂

供试材料: 废次烟叶(贵阳卷烟厂提供, 贵州产)。

试剂: 磷酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、乙酸、乙酸钠、无水乙醇、甲醇, 以上均为分析纯; 进口牛血清蛋白(上海源叶生物科技有限公司分装)为生化试剂; OPA (Agilent Technologies)、FMOC (Agilent Technologies)为衍生试剂; 混合氨基酸标准溶液 (Sigma-Aldrich)为标准试剂。

1.2 试验仪器与装置

试验仪器: PHS-3C 型精密 pH 计(上海精密科

收稿日期: 2013-06-05

基金项目: 贵州省科技公关项目(黔科合 SY 字[2010]3022 号)

作者简介: 魏赫楠(1989-), 女, 河北石家庄人, 在读硕士研究生, 研究方向: 化学工艺及资源综合利用。

E-mail: whn1011070223@163.com

学仪器有限公司)、XS-20B 多功能粉碎机(上海兆申科技有限公司)、ALC-110.4 电子天平(北京赛多利公司医疗设备厂)、OMNI-MIXER 变速匀浆机(美国路易企业有限公司)、THS-10 智能型超级恒温水槽(宁波天恒仪器厂)、H-1850R 型台式高速冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)。

本研究采用上海摩速科学器材有限公司生产的 MSM-2008 型试验用膜分离装置和膜组件,膜组件类型为内压式中空纤维超滤膜组件,膜材料为聚砜 PS,有效膜面积为 0.1 m^2 ,分子量截留值为 10 000。

1.3 试验方法

取整片的干烟叶去除叶脉、叶梗等,用粉碎机粉碎,过筛,称取 30 g 烟粉于烧杯中,加入 pH 值为 7.5 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液,经搅拌机搅拌均匀,在 4°C 、4 800 r/min 条件下离心 10 min 进行分离,收集上清液,即得到烟草蛋白质提取液。

试验采用全循环式进行超滤浓缩,分别在不同操作压强(0.03~0.14 MPa)、料液温度(22、32、 42°C)和料液 pH 值(2.0、3.0、4.0、5.0)条件下,每隔 5 min 记录通过超滤膜组件的原料液体积,共记录 60 min,并根据公式(1)计算膜组件的渗透通量。超滤 60 min 后,膜面渗透通量基本趋于稳定,取一定体积的透过液,采用凯氏定氮法分别测得透过液与原料液中的蛋白质含量,再根据公式(2)计算蛋白质的截留率。

$$J_c = \frac{\Delta V}{A \cdot \Delta t} \quad (1)$$

$$R = (1 - \frac{c_p}{c_f}) \times 100\% \quad (2)$$

式中: J_c 为渗透通量 [$\text{L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$], A 为有效膜面积 (m^2), Δt 为操作时间 (h), ΔV 为透过液的体积 (L); R 为蛋白质截留率, c_p 为透过液中溶质的质量浓度 (mg/L), c_f 为原液中溶质的质量浓度 (mg/L)。

2 结果与分析

2.1 操作压强对烟草蛋白质超滤提取效果的影响

在 pH 值 5.0、料液温度 22°C 的条件下对烟草蛋白质提取液进行超滤浓缩,因为本试验装置所提供的操作说明中规定,膜装置能承受的最大压强为 0.15 MPa,为了保护膜组件,操作压强的研究范围为 0.03~0.14 MPa,考察不同操作压强对渗透通量随时间的变化规律以及对浓缩液蛋白质截留率的影响。

由图 1 可知,随着操作压强的增大,渗透通量也随之增大,此过程是以压力为驱动力,压力大小直接决定了渗透通量的大小。在 0.03~0.07 MPa 的压力条件下,渗透通量随着时间延长而缓慢衰减;而在

0.10~0.14 MPa 压力条件下,前 20 min 内渗透通量迅速衰减,说明在此时间段内压力的升高导致了严重的浓差极化,膜污染加重。当压力达到较大数值时(超过 0.14 MPa),膜面吸附污染浓度不断增加,其浓度大于凝胶的饱和浓度,溶胶体变成了凝胶体,在膜面上形成了黏稠的凝胶极化层,此时,渗透通量由凝胶层的阻力决定,几乎不依赖于输液泵的压力^[10]。

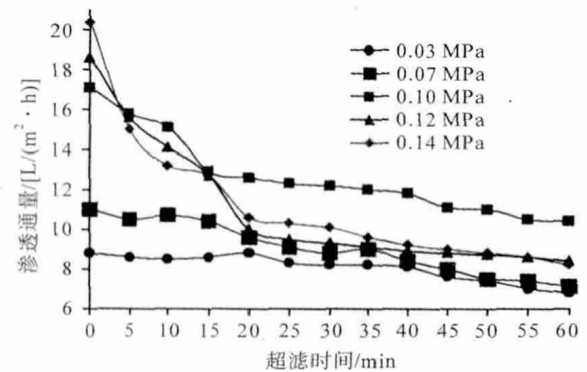


图 1 操作压强对渗透通量的影响

由图 2 来看,随着操作压强的增大,烟草蛋白质截留率逐渐降低。这可能是因为,操作压强较小时,膜面上浓差极化、凝胶层尚未完全形成,膜对料液直接进行机械筛分与截留,在压力推动下分子量小的物质通过超滤膜,压力越大使溶质透过超滤膜的推动力越大,更多的分子变性挤过滤孔,对需要截留的大分子物质来说,其截留率将随之降低^[11]。结合图 1 可以看出,在 0.10 MPa 压强下,其渗透通量随时间变化较为稳定,其蛋白质截留率也在 80% 以上。因此,综合渗透通量和蛋白质截留率考虑,选择 0.10 MPa 为最佳操作压强。

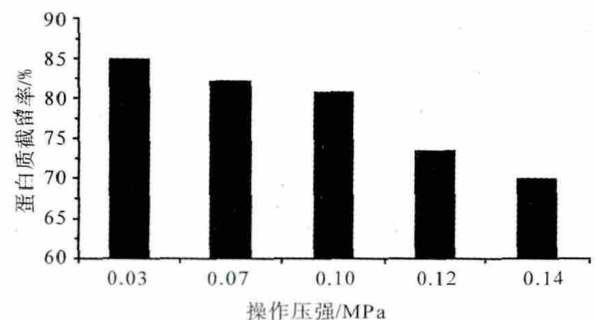


图 2 操作压强对蛋白质截留率的影响

2.2 料液温度对烟草蛋白质超滤提取效果的影响

在 pH 值 5.0、压强 0.10 MPa 的条件下,对烟草蛋白质提取液进行超滤浓缩,因为本试验装置所提供的操作说明中规定,膜组件的正常工作温度范围为 $5\sim 45^\circ\text{C}$,故选择 22、32、 42°C 3 个温度值考察不同料液温度对渗透通量随时间的变化规律以及对

浓缩液蛋白质截留率的影响。

由图 3 可以看出,随着料液温度的增加,渗透通量逐渐增大。这可能是因为,随温度逐渐升高,烟草蛋白质提取液黏度下降,扩散系数增大,传质系数也随之增大,膜面上的大分子物质向两侧溶液中扩散速度增加,从而相应减缓膜表面的浓差极化现象,此外,温度升高,蛋白质溶解度增大,降低了膜表面对蛋白质的吸附作用,因而影响膜通量增大。从图 3 也可以看出,渗透通量随时间的衰减速率也随着料液温度的升高而加快,这可能是因为当料液温度过高时,破坏了维系蛋白质稳定构象的氢键和范德华力,导致烟草蛋白质热变性程度加剧,浓差极化、凝胶极化严重,从而加重了膜的污染^[10-11]。

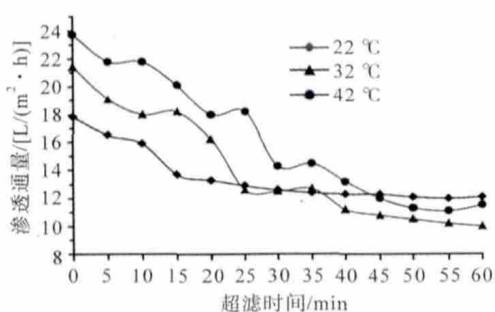


图 3 料液温度对渗透通量的影响

由图 4 可以看出,随着料液温度的升高,蛋白质截留率明显下降。因为温度升高时,加速了膜材料的微观布朗运动,料液中蛋白分子动能也增大,料液黏度下降,浓差极化减弱,而且凝胶层的厚度也相应减小,从而影响膜的截留性能,造成蛋白质截留率下降。综合考虑膜的性能、料液稳定性、蛋白截留率、节能以及操作方面,选择料液温度 22 °C 为最佳工作温度。

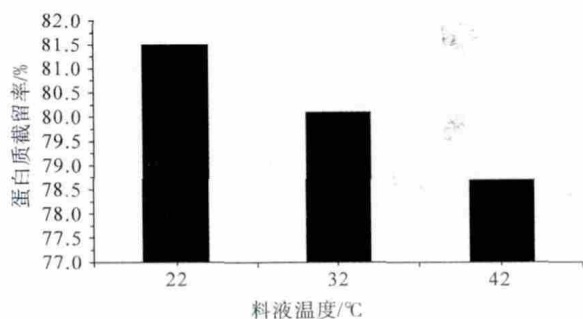


图 4 料液温度对蛋白质截留率的影响

2.3 料液 pH 值对烟草蛋白质超滤提取效果的影响

一般认为,溶液的 pH 值从 2 个方面影响超滤过程,一是影响蛋白质在水中的荷电性,由于蛋白质的两性性质,当溶液的 pH 值低于蛋白质的等电点

(pI)时,蛋白质带正电荷;高于蛋白质 pI 时,蛋白质带负电^[12];二是影响膜表面对蛋白质的吸附,当 pH 值偏离 pI 时,蛋白质溶解度大,溶质和溶剂的相互作用减小,将增加蛋白质在膜表面的吸附作用。此外溶液的 pH 值对超滤的影响还与膜材料自身的荷电性有关^[14-15]。本试验采用 PS-10 膜组件,在操作压强 0.10 MPa、料液温度 22 °C 条件下,调节烟草蛋白质提取液的 pH 值进行超滤浓缩,考察料液 pH 值对渗透通量随时间的变化规律以及对浓缩液蛋白质截留率的影响。

烟草蛋白质的 pI 大约在 4 左右。由图 5 可以看出,当 pH 值=4.0 时,渗透通量最小,这是因为此时溶液中蛋白质分子间的静电斥力为零,蛋白质溶解度最小,蛋白质分子极易析出并在膜表面聚集,形成蛋白质吸附层,所以渗透通量最低,衰减速度最大。当 pH 值偏离 pI 时,溶液中的蛋白质带相同电荷,此时蛋白质分子间的静电斥力增大,阻止蛋白质分子聚集,同时溶解性增大,使蛋白质分子不易在膜表面形成吸附层,所以渗透通量增大。由于 pH 值=2.0 或者 pH 值=3.0,小于蛋白质 pI 时,大部分蛋白质带正电荷,与聚砜膜表层负电荷的电性相异,膜表面对蛋白质的吸附性增大;当 pH 值大于蛋白质 pI 时,蛋白质带负电荷,与膜表层所带电荷相同,减小了膜表层对蛋白质的吸附作用,渗透通量增大。

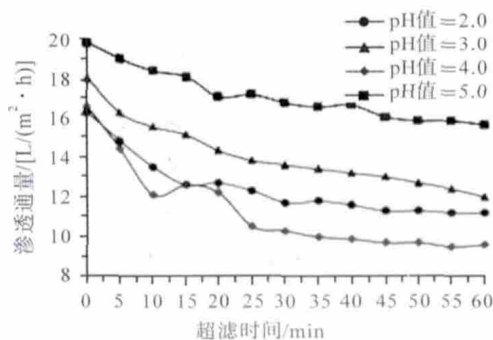


图 5 料液 pH 值对渗透通量的影响

由图 6 可以看出,提取液 pH 值对蛋白质截留率的影响不太明显,其截留率均在 80% 以上。pH 值为 4.0 时,即 pH 值=pI 值,蛋白质迅速聚集、吸附形成吸附层,膜孔阻力增大,蛋白质截留率达到最大; pH 值小于 pI 时,蛋白质与膜电荷相异,在膜表面形成吸附层阻碍蛋白质透过; pH 值大于 pI 时,蛋白质与膜电荷相同,斥力减少了蛋白质分子的聚集,使蛋白质分子不易透过超滤膜。因此,综合考虑渗透通量和蛋白截留率,选择 pH 值=5.0 为料液最佳 pH 值。

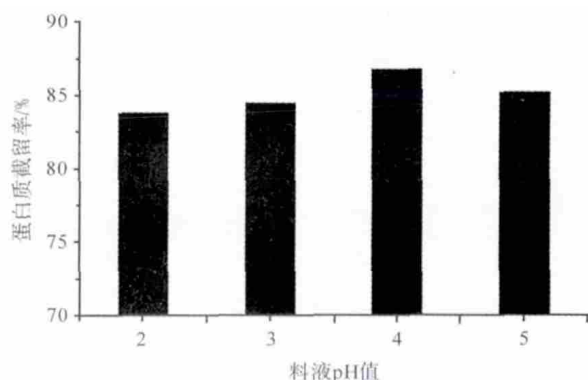


图 6 料液 pH 值对蛋白质截留率的影响

2.4 验证试验结果

在操作压强 0.10 MPa、料液温度 22 ℃、料液 pH 值 5.0 条件下超滤提取废次烟叶中的蛋白质, 3 次平行试验的蛋白质截留率分别为 83.15%、87.32%、85.13%, 平均为 85.20%。

3 结论与讨论

本研究结果表明, 以蛋白质提取率和渗透通量为指标综合考虑, 最终得到超滤法提取烟草蛋白质的最佳条件是: 操作压强 0.10 MPa、料液温度 22 ℃、料液 pH 值 5.0。此条件下超滤提取废次烟叶中蛋白质的平均截留率为 85.20%。因此, 采用超滤法提取废次烟叶中的蛋白质在技术上是可行的, 并且蛋白质提取率高, 蛋白质截留率较理想, 浓缩效果明显。

采用超滤膜法提取烟草蛋白质, 不仅可以有效地去除有毒物质, 而且可以提纯、浓缩蛋白质, 提高蛋白质提取率, 此外, 超滤分离提取还具有分离试验易扩大、从小试到大规模生产易实现等特点, 因此, 超滤膜分离是一种高效、低能耗、分子级过滤、无相变、无污染、易操作的分离技术, 在工业化生产中易实现规模化生产。

参考文献:

- [1] 赵谋明, 饶国华, 林伟锋. 烟草蛋白质研究进展[J]. 烟草科技/烟草化学, 2005(4): 31-34.
- [2] Zhang C M, Lillie R, Cotter J, *et al.* Lysozyme purification from tobacco extract by polyelectrolyte precipitation [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1069: 107-112.
- [3] Vansuyt G, Souche G, Straczek A, *et al.* Flux of proteins released by wild type and ferritin over-expressor tobacco plants; Effect of phosphorus and iron nutrition [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2003, 41: 27-33.
- [4] 张永锋, 王海, 马宁, 等. 超滤技术回收乳制品废水中蛋白质[J]. 化学工程, 2009, 39(3): 38-41.
- [5] 邵弘. 大豆乳清蛋白膜分离纯化技术研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨理工大学, 2007.
- [6] 李宝艳, 万端极. 超滤膜法制备豌豆蛋白的工艺[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(10): 75-77.
- [7] 陈钰. 马铃薯淀粉废水中的蛋白回收及表征[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.
- [8] 赵海珍. 用膜技术生产蔬菜汁[J]. 河南农业科学, 1991(12): 33-34.
- [9] 李丹. 膜技术分离纯化五毒棉籽蛋白多肽的研究[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2011: 1-15.
- [10] 王湛, 周翀. 膜分离技术基础[M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2006: 227-231.
- [11] 任俊艳. 超滤浓缩小麦淀粉/谷朊粉生产废水研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2006: 30-41.
- [12] 魏述众. 生物化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 1996.
- [13] 时均, 袁权, 高从阶. 膜技术手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [14] 孙彦. 生物分离工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998.
- [15] 严希康. 生化分离工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.