

酶解破壁促进废次烟叶中茄尼醇溶浸

王星敏, 张渝文, 张桂芝, 殷钟意

重庆工商大学环境与生物工程学院, 重庆 400067

王星敏, 张渝文, 张桂芝, 等. 酶解破壁促进废次烟叶中茄尼醇溶浸. 生物工程学报, 2013, 29(11): 1706-1710.

Wang XM, Zhang YW, Zhang GZ, et al. Improved extraction of solanesol from tobacco waste by enzymatic cell wall breaking. Chin J Biotech, 2013, 29(11): 1706-1710.

摘要: 协同应用纤维素酶和木质素酶催化降解废次烟叶, 探讨清洁高效的酶解破壁效应及浸提茄尼醇工艺条件。结果发现复配酶催化裂解溶浸茄尼醇效果明显优于单一酶, 酶解时间、温度、pH 值以及酶投加量等条件均影响酶破壁浸提茄尼醇能效。结果表明, 采用纤维素酶: 木质素酶酶活比 15:1 (U/U) 的复配酶, 在体积为 5 倍烟草质量的水介质环境中, 当复配酶投加量为 175 U/g, 水浴温度 40 °C, pH 为 6 时, 催化酶解烟叶 8 h 后, 茄尼醇溶浸浓度可达 0.33 g/L。在此条件下, 茄尼醇平均提取率可达 96.53%, 是化学回流浸提方法的 1.68 倍。该方法为有效提取废次烟草中茄尼醇提供了一种新途径。

关键词: 酶促反应, 茄尼醇, 废次烟草, 破壁, 提取

Improved extraction of solanesol from tobacco waste by enzymatic cell wall breaking

Xingmin Wang, Yuwen Zhang, Guizhi Zhang, and Zhongyi Yin

College of Environmental and Biological Engineering, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China

Abstract: To improve the extraction of solanesol from tobacco waste, we developed an enzymatic cell wall-breaking process with combined cellulase and ligninase. The effects of reaction time, temperature, pH and enzyme/substrate ratio were determined. The results show that the catalytic effect was better than either single enzyme when the ratio of cellulase to ligninase was 15:1 (U/U). Under the optimized conditions of 175 U/g (enzymes/substrate), tobacco to water 1:5 (W/W),

Received: January 23, 2013; **Accepted:** March 1, 2013

Supported by: Key Technologies Research and Development Program of Chongqing (No. cstc2011AB7060), Program for Chongqing Innovative Research Team Development in University (No. KJTD201020).

Corresponding author: Xingmin Wang. Tel: +86-13-527536325; Fax: +86-23-62768501; E-mail: wang_chem@tom.com

重庆市科技攻关项目 (No. cstc2011AB7060), 重庆市教委资源化学与利用项目 (No. KJTD201020) 资助。

网络出版时间: 2013-07-10

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130710.1613.001.html>

temperature 40 °C and pH 6.0, the concentration of solanesol in the solution could reach 0.33 g/L after 8 h. And the average leaching rate reached 96.53% which was 1.68 times of the extraction methods of chemical reflux. It provides new way for the extraction of solanesol from tobacco waste, and worthwhile to be further explored.

Keywords: enzymatic reaction, solanesol, tobacco waste, wall-broken, extraction

茄尼醇是三倍半萜醇^[1], 具有较强抗癌生物活性^[2-4], 常作为合成抗氧化物辅酶 Q10 不可替代的天然原料, 也是维生素 K2、抗艾兹病毒、治疗心脑血管病、肿瘤等新型药物的中间体, 广泛应用于人类医学中。目前, 国内外高纯度茄尼醇需求量以每年 15%~20% 递增, 含量 ≥90% 的精制品在国际市场上供不应求。现有提取茄尼醇的技术主要有溶剂萃取法、超临界萃取法、聚合态共沉淀法、分子蒸馏等^[5-7]。这些研究虽侧重于技术改进, 但强酸(碱)、高温(压)等反应条件不仅导致高能耗、高污染, 还易使茄尼醇发生加成、氧化、脱氢等反应, 或多或少存在步骤繁琐、成本高、能耗大、资源利用率低等缺失。将酶解工艺^[8-10]应用于茄尼醇的提取, 通过酶催化裂解植物纤维组织敏感键, 破坏纤维组织的结晶结构, 减少烟草中茄尼醇扩散、迁移的传质阻力, 增强茄尼醇溶浸能效, 提高提取率, 实现烟草减量化和资源化利用, 创造良好的社会效益。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

原料: 烟叶(取自重庆农户烟草下脚料)。

仪器: 126P/166P 高效液相色谱仪(美国贝克曼库尔特有限公司); KQ-400KDB 超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司); 80-2 型高速离心机(上海君竺仪器制造有限公司)。

试剂: 纤维素酶(5 000 U/g, 海林万力达集团公司); 木质素酶(1 400 U/g, 海林万力达集团公司)。

1.2 方法

1.2.1 酶催化浸提方法

称取 40~160 目烟叶 2.0 g 于 250 mL 锥形瓶中,

投加纤维素酶或木质素酶或复配酶, 加水调节 pH 值, 混匀后于恒定水浴温度下摇床酶解 6~12 h, 过滤, 滤液处理达标后排放; 滤渣转至 250 mL 锥形瓶中, 加入约 10 倍烟草质量(g)的甲醇-乙醇浸提液, 超声波浸提后, 得浸提粗液, 两次浓缩浸提粗液后得茄尼醇提取物; 工艺参数经单因素平行试验 3 次以上获得; 剩余渣待资源化开发利用。

1.2.2 检测方法

采用高效液相色谱法^[11]测定并计算茄尼醇浓度。流动相为 85% 的甲醇和 15% 的乙醇, 流速为 1.0 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长 210 nm。茄尼醇提取率计算公式如下:

$$\text{茄尼醇提取率}(\%) = \frac{c \times v \times N}{m \times 0.37\%} \times 100$$

其中, c 为茄尼醇浓度(g/L); v 为浸提液体积(mL); N 为稀释倍数; m 为烟草质量(g); 0.37% 为茄尼醇含量, 即采用传统化学法多次浸提直至其浓度检测为零时的茄尼醇所有量与烟草质量之比。

1.2.3 SEM 扫描及图像分析

制备样品固定于样品台, 经离子溅射仪上真空干燥、铂喷镀后, 于扫描电子显微镜上观察、拍摄取图。电镜工作电压为 5 kV、放大 2 000 倍。

2 结果与分析

2.1 茄尼醇浸提方式的比选

茄尼醇在烟叶组织内主要存于细胞线粒体内^[12], 并随烟草生长期逐渐由叶绿体向纤维组织转移。植物中木质素和半纤维素以共价键形式结合, 将纤维素分子包埋其中, 形成一种天然屏障^[13], 阻碍茄尼醇溶出。在相同条件下, 对比超声波提取、化学浸泡回流以及酶解工艺, 由图 1 可知, 酶解工

艺浸提茄尼醇的提取率为 75.5%，高于超声波提取；但二者协同作用，其提取率明显增高，达 85.7%。

分析化学浸泡回流后烟叶和酶解-超声波协同处理后的烟叶断面 SEM 照片 (图 2) 可知,化学浸泡回流后烟叶表面 (图 2A) 粗糙但完整;经复配酶酶解处理后的烟叶表面 (图 2B) 组织间有孔隙存在,而断面 (图 2C) 表面存有孔洞,表明经酶催化水解后烟叶内部形成了空隙结构,酶对烟草组织结构的蚀蚀现象明显,植物纤维组织界面保护层被打破,促使茄尼醇破壁溶出、运移和扩散。

2.2 酶解破壁促溶作用比较

植物组织致密结构阻碍茄尼醇溶出及传递^[12]。分析不同酶的活性,选用纤维素酶和木质素酶,研究不同酶、酶配比及酶量对茄尼醇溶出的影响。由

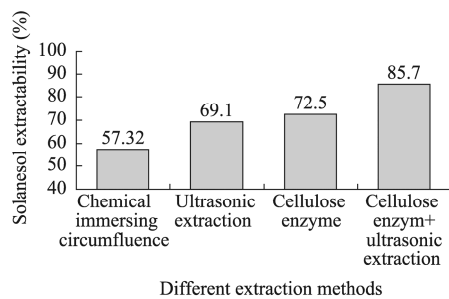


图 1 不同浸提方式对茄尼醇溶浸的影响

Fig. 1 Effect of different methods on extraction of solanesol.

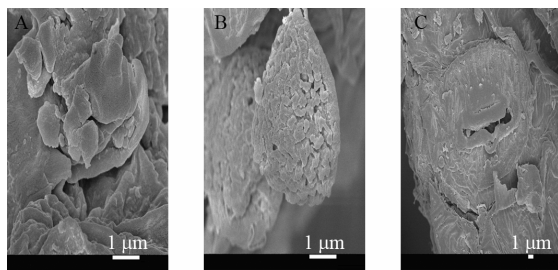


图 2 烟叶 SEM 扫描图片 (A: 化学浸泡回流后烟叶; B: 酶解后烟叶表面; C: 酶解后烟叶断面)

Fig. 2 Scanning electron micrographs of tobacco waste. (A) Surface of tobacco after chemical immersing circumfluence. (B) Surface of tobacco treated by cellulose enzyme and lignin enzyme. (C) Section of tobacco treated by cellulose enzyme and lignin enzyme.

图 3 可知,纤维素酶的酶解能效略优于木质素酶,而两酶组成的复配酶均优于单一酶;当纤维素酶:木质素酶酶活比为 15:1 (U/U)时,茄尼醇提取率可达 82.8%。这是因为纤维素酶由 C1 酶、Cx 酶和 β 葡糖苷酶组成, C1 酶破坏纤维素结晶结构, Cx 酶分解 β -1, 4-糖苷键, β 葡糖苷酶影响木质纤维素降解速度^[14],这种复杂酶系提升了烟草纤维组织水解协同性,故纤维素酶优于木质素酶。而复配酶则强化了纤维素酶与木质素酶的协同作用;其单位体积酶量直接影响酶催化活性中心与底物的结合几率^[15]。酶投加量增加,促进与底物有效接触结合几率,单位时间酶反应速度加快,增加茄尼醇溶浸量。当复配酶投加量为 175 U/g,茄尼醇提取率由 82.8% 增加到 87.6%。但水解产物会参与茄尼醇从植物表壁向外扩散的竞争,可能阻碍其溶出及运移。

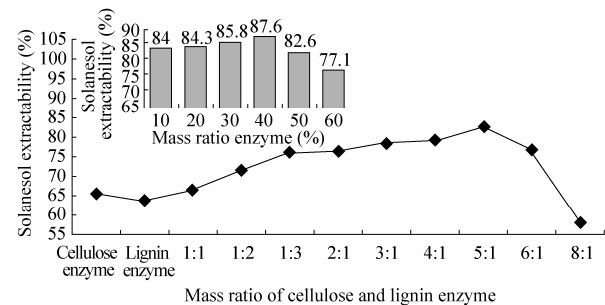


图 3 不同酶及其比对茄尼醇提取的影响

Fig. 3 Effect of different ratios of enzyme on extraction of solanesol.

2.3 酶破壁浸提茄尼醇条件优化

采用单因素实验依次考察酶解温度、pH 值、酶解时间、酶投加量以及固液比,优选出酶催化溶浸茄尼醇参数;参数初始值^[16]分别为酶解温度 30 °C, pH 值为 7, 时间 12 h, 固液比为 1:10。

2.3.1 酶解温度对茄尼醇溶浸的影响

酶的化学本质是一种蛋白质,对温度都非常敏感。由图 4 可以看出,当水浴温度为 40 °C 时,酶催化活力最充分,茄尼醇浓度最高,为 0.277 g/L;超过该温度,茄尼醇浸提浓度降低,表明酶随温度热变性加快,酶活力减小,水解速度下降。

2.3.2 不同 pH 值对茄尼醇溶浸的影响

酶蛋白分子的表面极性基团随体系 pH 值的变化而发生不同程度的解离,从而改变酶活性部位的原有构象,影响酶与底物的结合以及酶的催化能力。但过酸过碱都能使酶蛋白变性,使其丧失活性。从图 5 中可以看出,在 pH=6 时复配酶表现出最适应,茄尼醇浓度为 0.32g/L,提取率达到 85.6%。

2.3.3 酶解时间对茄尼醇溶浸的影响

酶催化活性中心与底物结合还受酶解时间的限制。由图 6 可以看出,酶催化水解烟草 8 h,茄尼醇溶浸能效最好,为 87.8%,浓度为 0.325 g/L。分析酶水解过程,即在非水溶性体系中,经木质素酶催化降解结构致密的木质素后,纤维素酶才有与纤维素结合机会。二者协同催化既分别作用,又连续进行,这与酶促反应及茄尼醇扩散传递相关^[15]。

2.3.4 不同固液比对茄尼醇溶浸的影响

酶外表面适度包覆适量水可促进酶促反应,提高酶活性。含水量过低,无法涂布酶表面,酶活力降低,茄尼醇提取率随之降低;含水量太高,加大

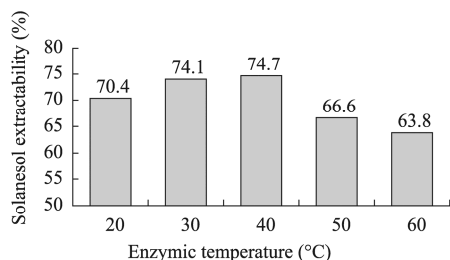


图 4 不同酶解温度对茄尼醇溶浸的影响

Fig. 4 Effect of different enzymic temperature on extraction of solanesol.

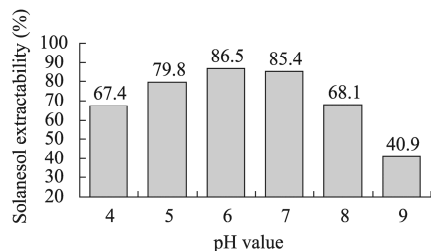


图 5 不同 pH 值对茄尼醇溶浸的影响

Fig. 5 Effect of different pH on extraction of solanesol.

酶与底物结合阻力。由图 7 可知,当烟草质量与水体积之比为 1:5 时,茄尼醇提取率可达 95.4%。

2.3.5 优化工艺参数浸提茄尼醇

通过以上单因素实验,优化得出酶破壁溶浸茄尼醇的工艺参数,即纤维素酶和木质素酶酶活比为 15:1 (U/U),复配酶投加量为 175 U/g,固液比为 1:5,水浴温度 40 °C, pH=6,酶解时间为 8 h。对比传统化学回流方法,采用酶解工艺破壁技术提取茄尼醇,在优化条件下,由表 1 可知,茄尼醇浓度可达 0.33 g/L,平均提取率为 96.53% (3 组平行实

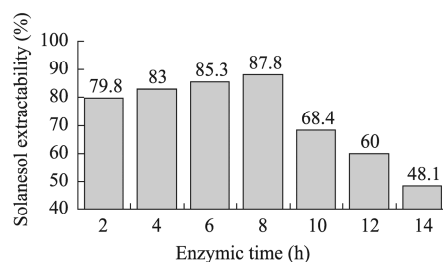


图 6 不同酶解时间对茄尼醇溶浸的影响

Fig. 6 Effect of different enzymic time on extraction of solanesol.

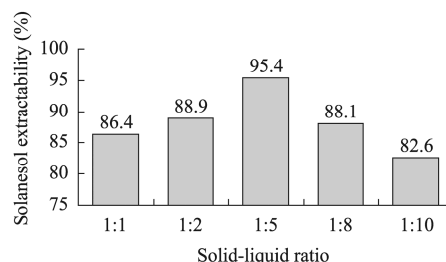


图 7 不同固液比对茄尼醇溶浸的影响

Fig. 7 Effect of different solid-liquid ratio on extraction of solanesol.

表 1 优化酶解工艺与化学浸泡回流能效对比 (平均数±标准偏差, n=3)

Table 1 Comparisons of enzymolysis with chemical reflux method on extraction of solanesol ($\bar{x} \pm s$, n=3)

No.	1	2	3	$\bar{x} \pm s$	Organic solvents (mL)	Reaction temperature (°C)	Extraction time (min)
Enzymic hydrolysis	96.43	96.82	96.30	96.55±0.27	20.00	40	30
Chemical reflux	57.92	57.17	57.10	57.40±0.45	50.00	65	50

验中最高达 97.3%), 高于任一单因素实验值, 是传统化学回流方法的 1.68 倍; 且 2 次浸提有机溶剂使用量 (40 mL) 低于化学回流的使用量 (50 mL)。

3 结论

协同应用复配酶 (纤维素酶和木质素酶) 可以催化降解植物组织提取废次烟叶中茄尼醇, 且复配酶催化裂解溶浸茄尼醇效果明显优于单一酶。对比分析酶解前后烟叶断面 SEM 照片发现, 酶催化水解有助于烟叶内部形成空隙结构, 有效打破烟叶植物组织结晶结构和界面保护层, 提高茄尼醇界面溶出。投入酶活比为 15 : 1 (U/U) 的纤维素酶-木质素酶组成的复配酶, 当投加量为 175 U/g 时, 在固液比为 1 : 5、水浴温度 40 °C、pH=6 的酶解条件下催化酶解烟叶 8 h 后, 烟草中茄尼醇溶浸浓度可达 0.33 g/L, 平均提取率为 96.53%。与传统化学回流方法对比, 该工艺反应条件温和, 有机溶剂使用量相对减少, 茄尼醇提取率是其 1.68 倍。

REFERENCES

- [1] Wen H, Zhen SL, Hai N, et al. Bioactivity of solanesol extracted from tobacco leaves with carbon dioxide-ethanol fluids. *Biochem Eng J*, 2008, 42: 92-96.
- [2] Alejandro RR, Maria-Ros'ario B, Manuel Nunes da Ponte. Supercritical fluid extraction of tobacco leaves: a preliminary study on the extraction of solanesol. *J Superer Fluids*, 2008, 45: 171-176.
- [3] Zhao CJ, Zu YG, Li CY. Extraction of solanesol from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves by bubble column. *Chem Eng Proc*, 2009, 48: 203-208.
- [4] Gu ZG, Wang Q. Progress of synthesis and application of solanesol. *Chem World*, 2006, 47(11): 692-695 (in Chinese). 顾正桂, 王琼. 茄尼醇的应用及衍生物的合成研究进展. *化学世界*, 2006, 47(11): 692-695.
- [5] Zhou LL, Cen Q, Zhao H, et al. Study on extraction of solanesol from tobacco leaves by supercritical fluid extraction and preparation of solanesol high purity quotient. *Chin Pharma J*, 2009, 44(2):147-149 (in Chinese). 周丽莉, 岑琴, 赵卉, 等. 烟叶中茄尼醇的超临界萃取及高纯度茄尼醇的制备. *中国药学杂志*, 2009, 44(2):147-149.
- [6] Liu L, Gu ZG, Gu MJ. Isolation of refined solanesol from tobacco extracts by separation integrated technology. *J Chem Chem Eng*, 2009, (12): 23-29.
- [7] Zu YG, Zhao CJ, Li CY. Homogenate extraction of solanesol from fresh tobacco leaves. *J Chem Eng Chin*, 2005, 19(16): 757-761 (in Chinese). 祖元刚, 赵春建, 李春英. 鲜法匀浆萃取烟叶中茄尼醇的研究. *高校化学工程学报*, 2005, 19(16): 757-761.
- [8] Wu HW, Xia F. Study on the use of the microwave-ultrasound-assisted extraction for the extraction of solanesol from tobacco leaves. *Hubei Agri Sci*, 2010, 49(2): 447-449 (in Chinese). 吴华伟, 夏帆. 微波-超声波协同提取烟叶中茄尼醇的工艺研究. *湖北农业科学*, 2010, 49(2): 447-449.
- [9] Wang XM, Xu LJ, Yin ZY, et al. Research on effective extraction of nicotine from tobacco waste by microbial enzyme reaction. *Chin J Environ Eng*, 2010, 4(12): 2875-2878 (in Chinese). 王星敏, 徐龙君, 殷钟意, 等. 生物酶促高效提制废次烟草中烟碱的研究. *环境工程学报*, 2010, 4(12): 2875-2878.
- [10] Kim Y, Mosier NS, Ladisch MR. Enzymatic digestion of liquid hot water pretreated hybrid poplar. *Biotechnol Prog*, 2009, 25(2): 340-348.
- [11] Rao RN, Talluri MV, Krishna TS, et al. Continuous counter current extraction, isolation and determination of solanesol in *Nicotiana tabacum* L. by non-aqueous reversed phase high performance liquid chromatography. *J Pharmac Biomed Anal*, 2008, 46: 310-315.
- [12] Zhu S, Zhang HB, Wang HX. Study on extraction and purification technology of solanesol from discarded tobacco. *J Anhui Agri Sci*, 2011, 39(21): 13080-13082 (in Chinese). 朱松, 张海波, 王洪新. 废次烟叶中茄尼醇的提取纯化工艺研究. *安徽农业科学*, 2011, 39(21): 13080-13082.
- [13] Olofsson K, Rudolf A, Lidén G. Designing simultaneous saccharification and fermentation for improved xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol*, 2008, 134: 112-120.
- [14] Fang X, Qin YQ, Li XZ, et al. Progress on cellulase and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chin J Biotech*, 2010, 26(7): 864-869 (in Chinese). 方翔, 秦玉琪, 李雪芝, 等. 纤维素酶与木质纤维素生物降解转化的研究进展. *生物工程学报*, 2010, 26(7): 864-869.
- [15] Wang ZL. *Extraction Microbial Transformation*. Beijing: Chemical Industry Press, 2012 (in Chinese). 王志龙. 萃取微生物转化. 北京: 化学工业出版社, 2012.
- [16] Machado PA, Fu H, Kratochvil RJ. Recovery of solanesol from tobacco as a value-added byproduct for alternative applications. *Biores Technol*, 2010, 101: 1091-1096.

(本文责编 郝丽芳)