

# 纤维素酶辅助提取烟叶黄酮最佳工艺研究

尹绘珍<sup>1</sup>, 张万明<sup>2\*</sup>, 付祥<sup>3</sup>

<sup>1</sup>西昌学院理学院, 四川 西昌

<sup>2</sup>西昌学院资源与环境学院, 四川 西昌

<sup>3</sup>四川应用技术职业学院, 四川 西昌

收稿日期: 2023年1月27日; 录用日期: 2023年2月17日; 发布日期: 2023年2月28日

## 摘要

烟叶粉经纤维素酶预处理后, 采用乙醇溶液加热回流提取烟叶中的黄酮, 并采用UV-VES测定在510 nm波长下的黄酮吸收值。采用单因素实验, 探讨了料液比、酶解温度、酶用量、酶解时间对烟叶黄酮的吸光值的影响; 并对以上四因素分别进行L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交实验, 以黄酮吸光值为指标确定适宜的正交试验参数, 得到酶辅助提取烟叶中黄酮的最佳提取工艺。研究表明, 纤维素酶辅助提取烟叶中黄酮最佳工艺为: 料液比1:26, 酶用量4%, 酶解温度50°C, 酶解时间2.5 h。

## 关键词

纤维素酶, 热回流法, 烟叶, 黄酮, 正交试验

# Study on the Optimal Process of Cellulase-Assisted Extraction of Flavonoids from Tobacco Leaves

Huizhen Yin<sup>1</sup>, Wangming Zhang<sup>2\*</sup>, Xiang Fu<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Collega of Science, Xichang University, Xichang Sichuan

<sup>2</sup>College of Resources and Environment, Xichang University, Xichang Sichuan

<sup>3</sup>Sichuan College of Applied Sciences, Xichang Sichuan

Received: Jan. 27<sup>th</sup>, 2023; accepted: Feb. 17<sup>th</sup>, 2023; published: Feb. 28<sup>th</sup>, 2023

## Abstract

Tobacco leaf powder pretreated with cellulase, the flavonoids in tobacco leaves are extracted by

\*通讯作者。

heating and refluxing with ethanol solution, the absorption value of flavonoids at 510 nm wavelength was measured by UV-VES. Using one-factor experiments, the effects of solid-liquid ratio, enzymatic hydrolysis temperature, enzyme dosage and enzymatic hydrolysis time on the absorbance of tobacco flavonoids were discussed; the  $L_9(3^4)$  orthogonal experiment was performed on the above four factors, respectively, the appropriate orthogonal test parameters were determined with the flavonoid absorbance value as an indicator, the optimal extraction process of enzyme-assisted extraction of flavonoids from tobacco leaves was obtained. Research shows that the optimal process of cellulase-assisted extraction of flavonoids from tobacco leaves is as follows: The solid-liquid ratio was 1:26, the enzyme dosage was 4%, the enzymatic hydrolysis temperature was 50°C, and the enzymatic hydrolysis time was 2.5 h.

## Keywords

Cellulase, Thermal Reflux Method, Tobacco Leaf, Flavonoids, Orthogonal Test

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

烟叶(学名: leaf tobacco)是草本植物[1], 最早种植于南美洲[2], 现中国各省区广为种植。其作用有: 1) 可作为烟叶工业使用的原料[3]; 2) 全株也可作为农药除虫剂[4]; 3) 也可作发汗、催吐剂、麻痹和镇静等医药作用[5] [6] [7], 这为开发烟叶提供了合理的理论依据。

目前通过查阅赵洪[8]、丁兴红[9]、化洪苓[10]等大量的文献发现, 黄酮的功效应用于多方面, 具有抗氧化能力及自由基消除能力, 其抗氧化能力能阻止细胞衰弱以及癌细胞的产生。具有良好的抗辐射效果且预防效果优于修复效果[11] [12] [13]。很多天然植物均含有黄酮类物质且其含量较为丰富, 如黄酮物质在烟叶中的含量就很丰富, 但对烟叶黄酮的提取研究很少见。因此, 本文通过一定的试验方法得出从烟叶中提取黄酮含量最高的试验条件。

现有的提取工艺有: 一次提取、直接提取、辅助提取、热回流试验等等多种试验方法[14]。本次试验主要以凉山州德昌县的烟叶为试验材料, 采取乙醇溶液热回流提取试验法提取黄酮, 此试验方法是采用各种物质在有机溶剂中的不同溶解度, 目前普遍采用从植物中提取活性组分, 例如  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $\text{CH}_3\text{OH}$  等。其具备纯度高、操作简便、成本低廉等优点, 同时本试验还用纤维素酶作为辅助, 可提高黄酮的吸光值。利用紫外可见分光光度计[15]测定其吸光值, 此方法操作简便, 结果准确率高, 为纤维素酶法辅助提取烟叶中黄酮的研究提供一定的理论参考依据。

## 2. 制备与测试

### 2.1. 试验材料

烟叶、纤维素酶(EA, 50 u/mg)、无水乙醇(AR)、硝酸铝·九水(AR)。

### 2.2. 试验过程和试验方法

干燥: 将约 2 kg 原料物烟叶的烟梗与烟叶分离, 弃去烟梗, 再将所剩烟叶放于真空干燥箱中 50°C 条件下干燥至恒重[16]。

粉碎过筛：将干燥后的烟叶立马放入陶瓷研钵中充分研磨，过筛 40 目，放于密封袋中备用。

酶解：称量 4 g 烟叶粉于烧杯中，加入 40 mL 纯化水，水浴加热到 45℃，然后加入一定量的纤维素酶，45℃ 下水浴加热 2 h，升温至 85℃ 灭活 15 min。

回流：向装有已酶解产物的烧杯中加入一定量的 75% 乙醇溶液于冷凝回流装置中加热回流 3 h。

抽滤：将回流得到的萃取液放于抽滤装置中抽滤，收集其滤液。

蒸发浓缩：将收集所得的滤液置于洁净干燥的坩埚中蒸发浓缩至接近糊状。

溶液配制：将浓缩后的产物放入烧杯中，加入少量的 75%  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  溶液溶解再转移于 50 mL 的容量瓶中定容，多次振动后备用。称取 25 g 硝酸铝粉末，用蒸馏水充分溶解并在 250 mL 容量瓶中定容备用。

吸光值的检测方法：取 1 mL 样品溶液，加入 2 mL 的 10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液，再加一定量的 75% 乙醇溶液定容至 25 mL，接下来，在紫外可见分光光度计仪器中，以 75% 乙醇溶液为参比溶液，在波长为 510 nm 处测定产物的吸光值，得出吸光值的平均值。

本试验采用 TU-1901 双光束紫外可见分光光度计进行烟叶中黄酮的吸光值测试[17] [18]。黄酮提取工艺流程见图 1。

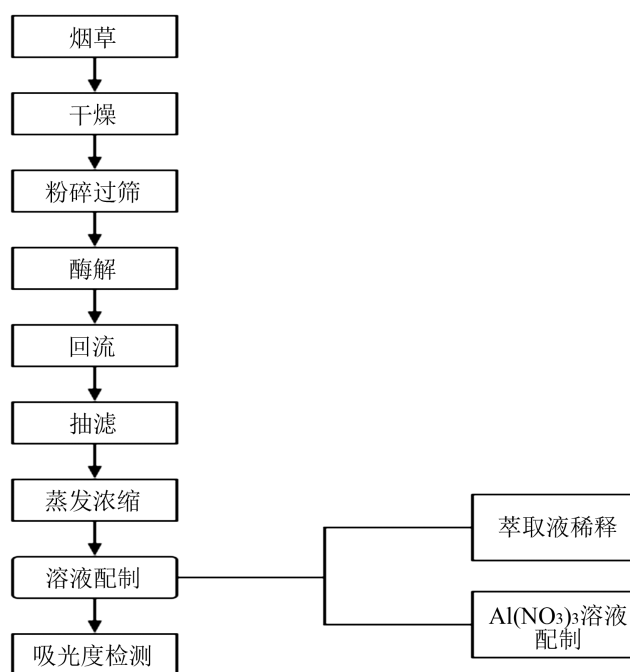


Figure 1. Flavone extraction process

图 1. 黄酮提取工艺流程

### 3. 试验结果与分析

#### 3.1. 单因素测定结果与分析

通过查阅唐功[19]、朱松[20]、陈建福[21]等关于纤维素酶对黄酮提取工艺的单因素试验的相关文献得出以下试验条件。

##### 3.1.1. 纤维素酶用量对黄酮提取工艺的影响

精确称取 5 份 4 g 烟叶粉放入烧杯中，均加入 40 mL 蒸馏水，水浴加热至 45℃，再分别加入 1%、2%、3%、4%、5% 的纤维素酶，其他条件不变，结果如图 2 所示。

由图 2 得, 当底物一定, 酶用量在 0%~3% 时, 其黄酮吸光值与酶用量成正比; 当酶用量增加到 3% 时, 黄酮的吸光值为最大, 其值为 0.292; 超过 3% 后, 其黄酮的吸光值与酶用量成负比。这也许是因为当酶用量小于最适值时, 酶解反应进行得不完全, 黄酮类物质释放出的量较少, 提取率较低, 则吸光值较低, 当酶用量达到最适值时, 酶解反应则较完全, 但当酶用量过多时, 酶与烟叶粉末的作用已达到过饱和, 酶解反应受到抑制, 降低了黄酮的吸光度。此试验结果与刘全德等的关于纤维素酶辅助提取野马追中黄酮的研究[22]、陈建福等的关于纤维素酶辅助提取柚叶中黄酮的研究[21]、赵洪等的关于纤维素酶提取竹叶黄酮研究[23]等研究结果相似。因此, 最佳的酶用量是 3%。

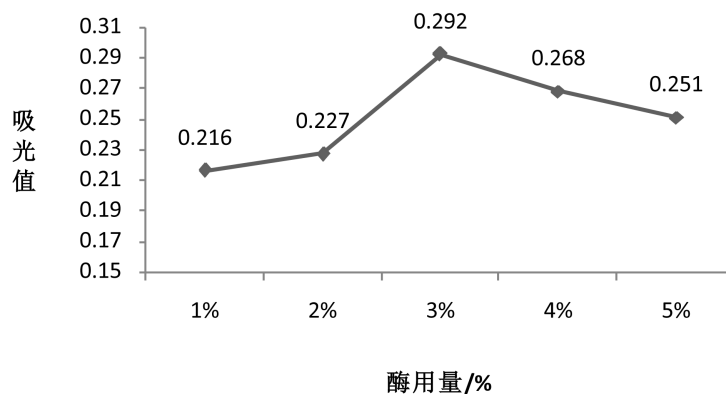


Figure 2. Effect of cellulase dosage on absorption value of flavonoids  
图 2. 纤维素酶用量对黄酮吸光值的影响

### 3.1.2. 酶解温度对黄酮提取工艺的影响

精确称取 5 份 4 g 烟叶粉放入烧杯中, 均加入 40 mL 蒸馏水, 水浴加热分别至 40℃、45℃、50℃、55℃、60℃, 再加入 3% 的纤维素酶, 酶解 2 h, 其他条件不变, 结果如图 3 所示。

由图 3 得, 当底物以及酶用量一定时, 随酶解温度的增加, 黄酮的吸光值总体上出现先增后减的趋势; 当温度在 55℃ 时, 黄酮的吸光值达到最大, 其值为 0.165。出现这种现象主要有两种原因: 第一, 在增加到最适温度前, 水浴温度增加, 酶活性增强, 反应速度加快; 第二, 随着温度持续增加, 纤维素酶的酶活性开始变小, 甚至失活, 同时由于黄酮不耐高温, 温度过高会破坏已提取出来的黄酮的化学结构, 从而导致吸光值降低; 低于 55℃ 时以第一种原因为主, 高于 55℃ 时以第二种原因为主。因此, 最佳的酶解温度是 55℃。

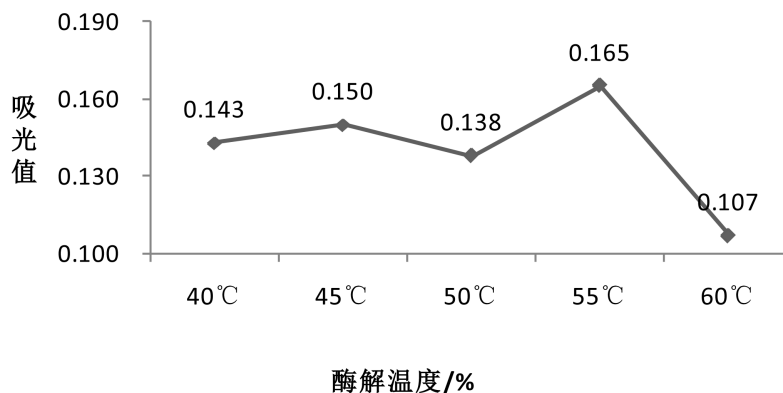


Figure 3. Effect of enzymatic hydrolysis temperature on absorption value of flavonoids  
图 3. 酶解温度对黄酮吸光值的影响

### 3.1.3. 酶解时间对黄酮提取工艺的影响

精确称取 5 份 4 g 烟叶粉放入烧杯中, 均放入 40 mL 蒸馏水, 水浴加热至 55℃, 再加入 3% 的纤维素酶, 分别酶解 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h, 其他条件不变, 结果如图 4 所示。

由图 4 得, 当底物、酶用量以及酶解温度一定时, 吸光值随着酶解时间的增加呈现先增再减的趋向, 当酶解时间为 2 h 时, 黄酮的吸光值达到最大, 其值为 0.184。其原因是由于酶解时间较短时, 酶与烟叶作用还未完全, 酶活力不能得到体现, 黄酮吸光值较低; 当酶解时间逐渐增加时, 黄酮吸光值增加, 但达到峰值后, 酶与烟叶接触面积不会继续增大, 黄酮吸光值无法再提高, 甚至出现了下降的现象。因此, 最佳的酶解时间是 2 h。

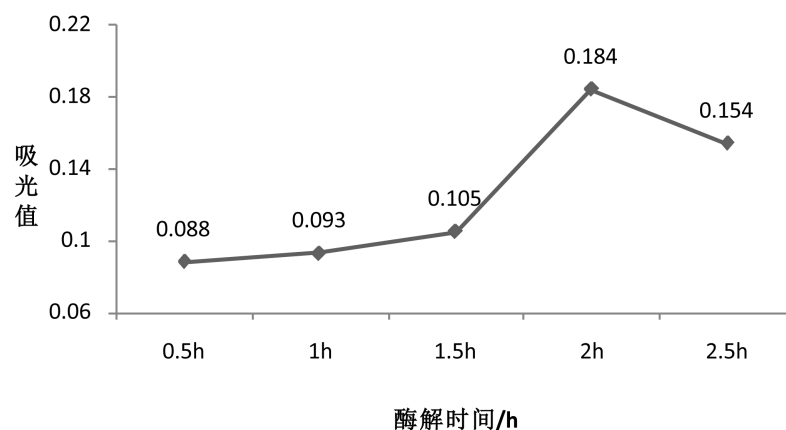


Figure 4. Effect of enzymatic hydrolysis time on absorption value of flavonoids

图 4. 酶解时间对黄酮吸光值的影响

### 3.1.4. 料液比对黄酮提取工艺的影响

精确称取 5 份 4 g 烟叶粉放入烧杯中, 均放入 40 mL 蒸馏水, 水浴加热至 55℃, 加入 3% 的纤维素酶, 酶解 2.5 h, 温度升高到 85℃ 灭酶 15 min, 以料液比分别为 1:10、1:14、1:18、1:22、1:26 加入 75% 乙醇溶液于加热回流 3 h。其他条件不变, 结果如图 5 所示。

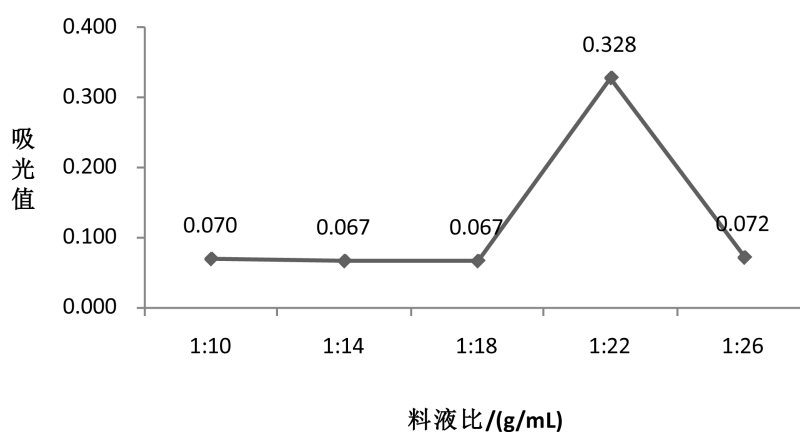


Figure 5. Effect of solid-liquid ratio on absorption value of flavonoids

图 5. 料液比对黄酮吸光值的影响

由图 5 得, 当底物、酶用量、酶解温度以及酶解时间一定时, 黄酮的吸光值随着料液比浓度的增加呈现了先增后减的趋向; 当料液比浓度增加到 1:22 时, 烟叶中黄酮的吸光值为最大值, 其值为 0.328。

出现这种现象的原因可能是当料液比较小时,即乙醇溶液的量较低,不利于黄酮类物质溶解,进而导致黄酮的吸光值低。而当料液比很高时,则其他杂质物质也会被提取出来,从而导致黄酮吸光值下降。因此,最佳的料液比是 1:22。

### 3.2. 正交试验测定结果与分析

通过查阅薛晶晶[24]、蒋卫国[25]、刘春波[26]、王云云[27]等关于纤维素酶对黄酮提取工艺的正交试验的相关文献得出以下试验条件。

#### 3.2.1. 纤维素酶酶解及有机溶剂提取条件的正交试验

**Table 1.** Factors and levels of orthogonal test

**表 1.** 正交试验因素和水平

水平	因素			
	A 料液比/(g/mL)	B 酶用量/%	C 酶解时间/h	D 酶解温度/°C
1	1:18	2	2.0	50
2	1:22	3	2.5	55
3	1:26	4	3.0	60

**Table 2.** Optimization of extraction of flavonoids from tobacco leaves by  $L_9(3^4)$  orthogonal test

**表 2.** 烟叶黄酮提取  $L_9(3^4)$  正交试验优化结果

试验号	因素				黄酮吸光值
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.096
2	1	2	2	2	0.215
3	1	3	3	3	0.159
4	2	1	2	3	0.109
5	2	2	3	1	0.115
6	2	3	1	2	0.129
7	3	1	3	2	0.168
8	3	2	1	3	0.156
9	3	3	2	1	0.509
I	0.470	0.373	0.381	0.720	
II	0.353	0.486	0.833	0.512	
III	0.833	0.797	0.442	0.424	
K1	0.157	0.124	0.127	0.240	
K2	0.118	0.162	0.278	0.171	
K3	0.278	0.266	0.147	0.141	
R	0.160	0.141	0.151	0.099	
最优水平	A <sub>3</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	
主次因素			A > C > B > D		
最优组合			A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> C <sub>2</sub> D <sub>1</sub>		

通过对以上四因素进行单因素试验, 最终得出了纤维素酶提辅助提取烟叶黄酮的单因素试验的最佳试验条件, 因此, 以料液比、酶用量、酶解温度及酶解时间等 4 个测试因素进行  $L_9(3^4)$  正交试验, 以烟叶总黄酮的吸光值为评价指标, 改善烟叶总黄酮提取条件, 以确定其最佳提取工艺。表 1 和表 2 分别表示因素水平表和正交试验结果。

由表 2 的正交试验结果可知, 对纤维素酶辅助提取烟叶中黄酮的影响因素为:  $A > C > B > D$ 。除了酶解温度对烟叶黄酮的吸光值影响较小, 其他三因素影响显著。由此得出, 纤维素酶辅助提取烟叶黄酮的最佳工艺为  $A_3B_3C_2D_1$ , 即料液比 1:26, 纤维素酶用量 4%, 酶解温度  $50^\circ\text{C}$ , 酶解时间 2.5 h。

### 3.2.2. 验证试验

按照正交试验条件下得出的最佳工艺(即烟叶粉末中加入 4% 纤维素酶, 在  $50^\circ\text{C}$  条件下, 酶解 2.5 h, 再加入料液比 1:26 的 75% 乙醇, 回流 3 h 等)进行试验, 测定烟叶黄酮的吸光度, 并计算其 RSD 值, 结果见表 3。由表 3 可知, 烟叶黄酮吸光值 RSD 值小于 3%, 说明通过正交试验得到的提取工艺条件合理可行。

**Table 3.** Process validation test

**表 3.** 工艺验证试验

编号	1	2	3
黄酮吸光值	0.504	0.518	0.495
RSD/%		2.292	

## 4. 讨论

纤维素酶能破坏植物的细胞壁及其果胶, 促进植物体内的物质排出[28]。有机萃取是一种利用各种物质溶解度的方法, 它具有操作简单, 纯度高, 成本低廉等特点。针对黄酮类物质常用醇类溶剂(如  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  和  $\text{CH}_3\text{OH}$ )作为提取剂。将纤维素酶与 75%  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  有机溶液结合, 不仅对植物细胞壁起到很好的破坏作用, 而且促进植物内物质的提取。

本单因素试验以及正交试验从烟叶中提取得到的黄酮吸光值均较低, 其原因可能是在试验过程中烟叶粉末浪费较多以及浓缩后的产物没有充分溶解于 75% 的乙醇溶液中, 从而造成最终测得的黄酮的吸光值偏低; 本单因素试验组数较少, 存在偶然性, 不能很精确的找出最适试验条件。因此, 在以后的烟叶提取黄酮最佳工艺研究中应进一步完善提取黄酮的试验条件, 且进一步改善试验操作方法, 最终选出最佳试验方案。

本正交试验, 在烟叶提取黄酮的试验中, 很好的解决了单因素试验过程中的浓缩后的产物没有充分溶解于 75% 乙醇溶液中的问题, 即当萃取液蒸发浓缩接近至糊状时, 边搅拌边用胶头滴管滴入少量的 75% 乙醇溶液, 通过这样操作能很好的将残留在玻璃棒上面的萃取液的质量降到最低。

本实验虽与薛晶晶、蒋卫国、刘春波、王云云等关于纤维素酶对黄酮提取工艺的正交试验的相关实验的实验条件相同, 但是并不是重复性实验, 因为以上作者虽开展了提取黄酮的实验, 并取得了很好的研究成果, 但未提取烟叶中的黄酮, 因此该实验并不是重复性实验。

本实验由于是在本科实验室里进行的, 实验仪器和药品有限, 因此就本科阶段而言, 该提取方法是最优的一种方法。

## 5. 结论

通过纤维素酶辅助提取工艺, 得出了烟叶中黄酮提取的最佳条件为: 料液比 1:26, 纤维素酶用量 4%,



酶解温度 50℃, 酶解时间 2.5 h。

本试验的研究有望走出实验室规模阶段, 走进工业化生产阶段, 通过对烟叶中黄酮提取条件的研究, 不仅找出了提取黄酮最佳提取工艺研究, 而且从实验室阶段出发将成本控制一定范围内, 从而减少工业生产成本。

## 基金项目

四川省质量工程项目(川教函[2019] 31 号); 西昌学院两高课题(LGLZ201812); 凉山州人力资源与社会保障局学术带头人重点项目(ZXS201802)。

## 参考文献

- [1] 骆莉, 周璐, 符黄喜, 等. 生物酶解法萃取废次烟叶的研究[J]. 广东农业科学, 2011, 38(17): 18-20.
- [2] 李昱霖, 丁应福, 王胜雷, 等. 烤烟烘烤过程风机频率对叶温和烟叶变黄失水的影响[J]. 河南农业科学, 2022, 51(3): 173-180.
- [3] 阙远慧, 何轶, 喻奇伟, 等. 烟叶含梗率性状的鉴定方法研究[J]. 特产研究, 2022, 44(2): 90-94.
- [4] 雷云康, 谭舒, 曾旸, 等. 德阳雪茄烟叶的农业发酵研究[J]. 智慧农业导刊, 2022, 2(6): 39-41.
- [5] 王俊锋, 韦忠, 岑章斌, 等. 精细化烘烤技术在 K326 品种中部烟叶烘烤中的应用[J]. 现代农业科技, 2022(6): 177-180.
- [6] 王树林, 向盼来, 高攀, 等. 玉溪烤烟单叶重现状分析与烟叶质量提升对策[J]. 农业与技术, 2022, 42(5): 39-41.
- [7] 曾涛, 宗钊辉, 胡亚杰, 等. 烟叶颜色指标值与烟叶褐变程度及其内在化学成分相关分析[J]. 安徽农业科学, 2022, 50(5): 170-173.
- [8] 赵洪, 杨颖, 黎李. 碱溶液提取竹叶总黄酮工艺的初步研究[J]. 山东化工, 2015, 44(13): 58-59.
- [9] 丁兴红, 孙杰, 喻治霞, 等. 纤维素酶辅助提取银杏叶总黄酮的工艺条件[J]. 林业科技开发, 2009, 23(4): 66-68.
- [10] 化洪苓. 发酵提高刺五加黄酮工艺及抗辐射功能研究[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2018.
- [11] 翟翊然, 曹丽楠, 李伟栋, 等. 基于 MAPK/ERK/JNK 信号通路探究染料木黄酮对荨麻疹大鼠的保护作用[J]. 现代药物与临床, 2022, 37(3): 458-465.
- [12] 薛海波, 张洁茵, 金思洋, 等. 乌饭树叶黄酮对 UHT 奶加工过程中晚期糖基化末端产物的抑制作用[J]. 常熟理工学院学报, 2022, 36(2): 27-31.
- [13] 张家音, 李浩楠, 雷嗣超, 等. 板栗壳黄酮提取工艺优化及其组成分析[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(6): 50-59.
- [14] 景联鹏, 唐徐禹, 顾丽莉, 等. 植物中黄酮类化合物提取技术研究进展[J]. 纤维素科学与技术, 2021, 29(4): 60-70.
- [15] 曹婧, 侯春久, 黄志飘. 响应面法优化竹叶黄酮的提取工艺[J]. 中国中医药现代远程教育, 2018, 16(7): 99-101.
- [16] 黄振瑞, 柳颖, 黎志德. 酶解预处理工艺在烟叶茄尼醇提取中的应用[J]. 中国烟叶科学, 2022, 43(1): 89-95.
- [17] 辛宏斌. TU-1901 双光束紫外可见分光光度计的分析研究[J]. 仪器仪表与分析监测, 2014(1): 29-31.
- [18] 朱英, 和惠朋, 武晓博, 张学俊. 紫外可见分光光度计及其应用[J]. 化工中间体, 2012, 9(11): 34-37.
- [19] 唐功, 王柯然, 朱欣, 朱晗焱. 不同酶辅助提取毛竹叶中黄酮的工艺研究[J]. 甘肃科技, 2021, 37(20): 65-66, 39.
- [20] 朱松, 姜在祥, 陈尚卫, 等. 超声辅助酶法提取废次烟叶中绿原酸、烟碱工艺研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(5): 181-184.
- [21] 陈建福, 曾勤, 吴丽敏, 曾小芳. 纤维素酶辅助提取柚叶总黄酮的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(17): 25-30.
- [22] 刘全德, 李超. 纤维素酶辅助提取野马追总黄酮的工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2011(5): 78-81.
- [23] 赵洪, 欧秀蓉. 纤维素酶提取竹叶黄酮工艺初步研究[J]. 广州化工, 2015, 43(15): 80-81.
- [24] 薛晶晶, 乔婧, 高建德, 刘雄. 酶辅助提取纯化芹菜总黄酮的工艺研究[J]. 中兽医医药杂志, 2019, 38(6): 73-76.
- [25] 蒋卫国, 黄龙, 彤霖, 等. 正交实验法优选半仿生提取废次白肋烟叶烟碱的工艺研究[J]. 数理医药学杂志, 2012, 25(6): 672-675.



- 
- [26] 刘春波, 于昊辰, 李易丞, 周迎春. 从烟叶中提取烟碱的工艺条件优化[J]. 辽宁化工, 2019, 48(1): 24-26.
- [27] 王云云, 华燕青, 袁秀平, 刘炳琪. 野生甘檬桤柳总黄酮提取工艺及活性研究[J]. 饲料研究, 2021, 44(18): 83-86.
- [28] 莫雪婷, 覃逸明, 郭松. 紫苏黄酮的提取及生物活性的研究进展[J]. 山东化工, 2021, 50(16): 84-87.