

烟草叶蛋白提取技术研究进展

李猛政, 李荣华, 夏岩石, 郭培国*

(广州大学生命科学学院, 广州 510006)

摘要:烟草除了可以作为卷烟原料外,其叶蛋白也是世界上最丰富的蛋白质资源之一。烟叶中的蛋白质分为可溶性蛋白质和不溶性蛋白质,其中约一半的可溶性蛋白是FI蛋白(Fraction I protein),另一半是FII蛋白(Fraction II protein)。随着科学的发展,许多新技术已应用于蛋白质分离,如双水相萃取法、超滤法、层析法、电泳法等。本文根据国内外相关研究资料,对目前分离烟草叶蛋白常用的几种提取技术及进展进行了综述和讨论,并展望了其应用前景。

关键词:烟草;叶蛋白;提取技术;研究进展

Research Progress on Extraction Technology of Tobacco Leaf Proteins

LI Mengzheng, LI Ronghua, XIA Yanshi, GUO Peiguo*

(College of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Tobacco is the raw material of cigarettes in general, but its leaf is one of the most abundant protein resources in the world. The proteins in tobacco leaves can be divided into water-soluble and water-insoluble proteins. Half of the soluble proteins are FI proteins (Fraction I proteins), and the other half are FII proteins (Fraction II proteins). With the development of technology, many new technologies have been applied to protein separation, such as aqueous two-phase extraction, ultrafiltration, chromatography, and electrophoresis. According to the relevant research literatures at home and abroad, several commonly used extraction techniques and the latest progress for separating tobacco leaf proteins were reviewed and discussed in this article, and their application prospects were described.

Keywords: tobacco; leaf protein; extraction technology; research progress

我国是烟草最主要的生产国和消费国之一,每年烟草的种植面积可达100万 hm^2 ,生产烟叶约175万t^[1]。蛋白质是烟草众多生物活性成分中含量最为丰富的一种,其在白肋烟中的含量高达20.48%^[2]。随着对蛋白质研究的不断深入,人们逐渐认识到植物叶蛋白,尤其是烟草叶片中的蛋白质^[3],是世界天然产物中最重要且丰富的蛋白质资源。

从营养、医疗和食品角度来评价,烟草叶蛋白属于优质蛋白^[4]。烟草叶蛋白的氨基酸组成和含量相当丰富、均衡,所含的必需氨基酸与鸡蛋、牛奶相接近,用它可以代替牛奶,可为因乳糖不耐受而不宜饮用牛奶的人提供另一种高营养食品蛋白源^[5]。烟草叶蛋白中富含硒,以硒蛋氨酸和硒半胱氨酸或其他形式存在^[6],在清除自由基、防护红细胞溶血、化学性肝损伤保护等方面都优于不含硒的蛋白质^[7]。烟草叶蛋白经酶水解提取出的活性十三肽,具有抗

菌活性和蛋白酶抑制活性^[8-9],且稳定性较高,是制备抗菌肽和降压肽的重要潜在资源。另外,烟草作为最重要的植物生物反应器^[10-12],其叶片生物量大(约100 t/hm^2)、叶片可溶性蛋白含量高、有完善的真核表达系统,可以为多种外源蛋白提供正确的翻译后修饰(PTM),表达具有生物活性的外源重组蛋白,可以应用于人或动物的疾病治疗及预防。

在烟草的种植和加工过程中会有大量的低次烟叶产生,这些低次烟叶往往蛋白质含量较高,会导致烟气中有害物质增加,除少量用于生产烟膏和农药外,大部分被抛弃,既浪费了大量宝贵的资源,又污染了环境。如果可以从低次烟叶中提取蛋白质,那么烟草的利用率和附加值将大大提高。本文根据国内外相关研究资料,对目前分离烟草叶蛋白常用的几种提取技术及进展进行了综述和讨论,并展望了其应用前景。

基金项目:广东省烟草专卖局(公司)科技计划项目(201310、201403、201702)

作者简介:李猛政(1995-),男,在读硕士研究生,研究方向为生物化学工程。E-mail:leemzheng@163.com。*通信作者,E-mail:guopg@gzhu.edu.cn

收稿日期:2020-10-04

修回日期:2021-01-19

烟草叶蛋白可分为可溶性蛋白质和不溶性蛋白质,其中约有一半的可溶性蛋白质是叶绿体蛋白质,即FI蛋白(Fraction I protein),其结晶为六角形、十二面体,大小为18 S,在其酶功能相关研究中又称为核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(简称Rubisco);另一半是其他可溶性蛋白质的复合物,即FII蛋白(Fraction II protein),大小为4~6 S^[13]。烟草是唯一可以通过结晶大量提取FI蛋白的植物,鲜烟叶可溶性蛋白提取量如表1所示。

表1 鲜烟叶中可溶性蛋白提取量^[14]

Table 1 Extraction amount of soluble proteins in fresh tobacco leaves g/kg

蛋白质类型	粗提	分离	精提
Protein type	Rough extraction	Separation	Refined extraction
可溶性蛋白	15.98	13.77	11.39
Soluble protein			
FI 蛋白	7.65	6.48	5.12
Fraction I protein			
FII 蛋白	8.33	7.29	6.27
Fraction II protein			

1 根据蛋白质溶解度不同进行分离提取

1.1 酸碱提取法

酸碱提取法是提取叶蛋白的传统方法,也是目前应用较为广泛的方法^[15],利用蛋白质等电点沉降和高温变性的特点,通过对pH的调节及温度的控制,使蛋白沉淀^[16],从而得到烟草叶片的粗蛋白。赵谋明等^[17]以低次烟叶为原料,采用氢氧化钾和磷酸调整pH,在料液比1:17、提取温度60℃、pH 8.0的条件下磨浆2次;然后在温度60℃,pH 8.0,时间60 min,搅拌条件下碱溶提取3次;最后在pH 3.0,4℃下静置8 h,4800 r/min、20℃离心30 min,烟叶蛋白提取率最高可达86.71%。田少君等^[18]在单因素试验的基础上,选择pH、加热时间和加盐比例为自变量,以烟叶蛋白的提取率为响应值,研究各自及交互作用下对烟叶蛋白提取率的影响,结果得出pH和加热时间对烟叶蛋白提取率的影响不存在交互作用,pH对烟叶蛋白提取率的影响更为显著。卫青等^[19]为回收薄片厂抄造段浓白水中的蛋白质,减少造纸法再造烟叶生产中有机物对环境的污染,分析pH对提取烟叶蛋白的影响,结果发现,

当碱沉pH一定时,烟叶蛋白在酸溶pH为3.5处沉淀量最大;当酸溶pH一定时,烟叶蛋白在碱沉pH为8.0处沉淀量最大,所以得到最佳提取工艺参数为酸溶pH=3.5,碱沉pH=8.0。

1.2 有机溶剂提取法

酚提法是一种常用的有机溶剂提取方法,用含有30% (m/V) 蔗糖的苯酚提取液充分溶解烟叶粉末,通过甲醇或丙酮沉淀对酚相中的蛋白进行纯化和浓缩,而多糖、核酸等水溶性物质则留在水相中^[20],具有较高的分辨率。韦玉梅等^[21]使用含十二烷基硫酸钠(SDS)的缓冲液来增加烟叶蛋白的溶解度,利用酚在SDS这种阴离子型表面活性剂存在的条件下能充分溶解蛋白的特点,可以在较短的时间内充分溶解烟叶蛋白,得到较高纯度的蛋白质,所获双向电泳(2-DE)图谱中蛋白质点多且清晰,背景干净,重复性好。尤垂淮等^[22]以烟草主栽培品种K326为材料,比较了5种不同植物叶蛋白样品制备方法对双向电泳分析结果的影响,结果表明采用苯酚提取烟叶蛋白的方法较可靠,去除了烟草叶片酚类、色素和多糖等干扰蛋白质提取的物质,可以有效减少烟叶蛋白在提取过程中的损失,获得的2-DE图谱中蛋白质点数量最多,最清晰,分离效果好。

三氯乙酸(TCA)/丙酮沉淀法是植物蛋白样品制备最基本的方法,最初由DAMERVAL等^[23]设计,利用蛋白质在酸性和疏水条件下变性的原理进行分离提取,并能有效去除污染物,达到富集蛋白质的效果。王绍美等^[24]研究了旺长后期和苗期烟草叶蛋白样品的制备方法,分别采用稍加改进的TCA/丙酮法和蛋白质分级提取、酚抽提及丙酮洗涤相结合的方法,建立了适用于不同发育时期烟草叶片蛋白质组研究的双向电泳实验体系。旺长后期的烟草叶蛋白样品经过TCA/丙酮提取,预冷丙酮沉淀2次后,选用pH 4~7的17 cm IPG (immobilized pH gradient) 预制胶条,上样体积170 μL (总上样量1 mg),可以得到重复性较好,蛋白质点清晰的2-DE图谱;苗期烟草叶蛋白样品通过蛋白质分级提取、酚抽提及丙酮洗涤后,选用pH 4~7的24 cm 线性IPG胶条,水化12 h上样,上样体积450 μL (总蛋白量1.5 mg),可以得到背景干净,蛋白质点清晰的2-DE图谱。

1.3 双水相萃取法

双水相萃取法(ATPE)是一种易于放大、操作条件温和、可连续化操作的新型提取技术。双水相萃取与传统的萃取原理相似,都是利用蛋白质在两相间的选择分配差异而进行分离纯化,不同之处在于萃取体系的性质。当蛋白质进入双水相体系后,在范德华力、疏水作用、静电作用和界面张力的作用下,选择性地富集到上相或下相,从而实现目标蛋白与杂质的选择性分离^[25]。BALASUBRAMANIAM等^[26]研究了以蛋清溶菌酶(碱性蛋白)为模型蛋白使用ATPE从烟草蛋白中纯化重组蛋白的适用性,通过改变聚乙二醇(PEG)的分子量、PEG浓度、无机盐的种类和浓度、pH等条件来得到烟草蛋白在聚合物-盐双水相体系中的最佳分配系数。结果发现PEG/硫酸钠系统最适合蛋清溶菌酶的纯化,当满足pH为7.0、PEG(分子量为3400)质量分数为10%、硫酸钠质量分数为16.2%且氯化钠浓度保持在0.19 mol/L时,可以得到蛋清溶菌酶87%的产率。ROSS等^[27]研究了使用ATPE分离纯化酸性蛋白的可行性,以烟草转基因酸性重组蛋白 β -葡萄糖醛酸苷酶(rGUS)为目标蛋白,通过部分析因设计(fractional factorial designs)的筛选实验,确定了PEG/磷酸钾为纯化rGUS的最佳双水相系统,经过响应面法(RSM)分析,当满足pH为8.0、PEG(分子量为3400)质量分数为13.4%、磷酸钾质量分数为18%且氯化钠浓度保持在0.789 mol/L时,得到的rGUS回收率最大,可达74%。ATPE用于分离纯化蛋白质是替代昂贵层析法非常有前景的方法,但大规模生产应用还需解决相系统的恢复问题。

1.4 结晶和重结晶法

结晶法是某种物质通过降温或蒸发的方法在浸提液中以晶体状析出的过程。初次结晶所获得的晶体多含杂质,通过再次结晶可以获得较纯的晶体,这一过程也被称为重结晶^[28]。郭培国等^[14]为了简捷大量地提取烟叶中FI蛋白,经过反复研究和探索,发现新鲜烟叶经亚硫酸钠溶液处理后再加入防褐变剂,可抑制或除去多酚氧化酶活性,大大降低粗提液的褐变程度;又根据FI蛋白多种物理化学特性与其他蛋白的差异,如盐溶性、耐热性、化学试剂反应等,初步将FI蛋白与其他蛋白分离及除去有色

物质,在低温等条件下加入少量FI蛋白晶体,保存2~3 d后,有大量白色晶体析出,再经过脱盐处理,可以得到纯净的FI蛋白晶体,最终每千克鲜烟叶可提取FI蛋白5.12 g, FII蛋白6.27 g,总提取率为71.28%。

2 根据蛋白质分子量不同进行分离提取

2.1 超滤膜法

膜分离技术是以压力为推动力,依靠膜的选择性,将液体中的组分进行分离的方法,包括微滤(MF)、超滤(UF)、纳滤(NF)和反渗透(RO)4种。SHI等^[29]采用中空纤维UF-NF-RO膜集成工艺从废弃烟叶中提取纯化烟叶蛋白,在连续的超滤和纳滤中,烟叶蛋白的截留率分别达到87.9%和98.5%,所产生的废水经中空纤维反渗透膜过滤后,可无害化处理。魏赫楠等^[30]为优化超滤膜提取烟叶蛋白的工艺参数,以蛋白质截留率和渗透通量为综合指标,系统讨论了提取温度、料液pH和操作压强对烟叶蛋白提取率的影响,最终得到提取烟叶蛋白的最佳工艺参数为提取温度22℃、料液pH 5.0、操作压强0.10 MPa,烟叶蛋白的平均截留率可达85.2%。膜分离过程没有相变,能够保持天然蛋白质的物理化学特性,但是膜两侧浓度差异和膜结垢会引起膜渗透通量减少,从而影响分离效果,因此需要定期清理膜污染或者增加膜的疏水性以提高膜的防污性能。

2.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)是对蛋白质进行量化、比较及特性鉴定的常用方法,具有经济、快速和可重复等特点,是依据蛋白质的分子量对其进行分离的提取技术。HEIDARI-JAPELAGHI等^[31]为了在烟草中生产重组人干扰素- γ (hIFN- γ)蛋白,通过农杆菌侵染法使携带pCAMBIA-Zera-IFN- γ 载体的GV3101菌株侵入烟草植株(*N. tabacum* cv. Samsun)中瞬时表达hIFE- γ 蛋白,用1 mL提取缓冲液(50 mmol/L Na_3PO_4 , pH 8.0; 150 mmol/L NaCl; 1 mmol/L EDTA; 2%聚乙烯吡咯烷酮[PVP])对研磨后约500 mg受侵染烟叶样品充分浸提,在14000 r/min、4℃下离心20 min,去除沉淀后得到总可溶性蛋白(TSP),然

后用浓度为 12.5% 的聚丙烯酰胺进行 SDS-PAGE, 分离出分子量为 23 kDa 的重组 hIFN- γ 蛋白; 通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 算出重组 hIFN- γ 蛋白浓度为 19.18 $\mu\text{g/g}$, 再对重组 hIFN- γ 蛋白进行抗病毒活性检测, 结果发现其有良好的抗病毒活性, 且与标准 hIFN- γ 蛋白抗病毒水平相似。SEDAGHATI 等^[32]为了比较不同基因型烟草中人血清白蛋白 (HSA) 基因的瞬时表达水平, 将携带 pBI121-HSA 二元载体的农杆菌菌株分别侵入 *N. benthamiana*、*N. tabacum* cv. Xanthi 和 Samsun 3 种基因型烟草植株中, 称取 500 mg 受侵染烟叶组织样品研磨成粉末状, 用 1 mL 提取缓冲液 (50 mmol/L Na_3PO_4 , pH 7.0; 150 mmol/L NaCl; 1 mmol/L EDTA; 2% 聚乙烯吡咯烷酮[PVP]) 充分浸提后, 在 13000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 22 min, 保留上清液, 再经过 12% SDS-PAGE 分离得到分子量为 66.5 kDa 的重组 HSA; 通过蛋白质印迹法 (Western Blot) 进一步验证了重组 HSA 在所有基因型烟草中均能成功表达, 并用 ELISA 分析得出 Samsun 中的重组 HSA 表达量最高, 分别是 *N. benthamiana* 的 2.4 倍、Xanthi 的 1.6 倍, 最高浓度约 15.6 $\mu\text{g/g}$ 。

2.3 凝胶过滤法

凝胶过滤法是根据蛋白质分子量不同在色谱柱中的分配速度不同, 分子量大的流出比分子量小的快, 进而分离的方法。LOWE^[33]将大量新鲜烟叶投入到少量浓氯化钠溶液 (5 mol/L) 中进行匀浆, 采用 Sephadex G-50 交联葡聚糖凝胶柱对烟叶蛋白粗提液进行脱盐除杂处理, 结晶蛋白得率较高; 但该方法操作难, 容易损坏捣碎机, 限制了蛋白结晶的制备规模^[34]。

3 根据蛋白质所带电荷不同进行分离提取

3.1 离子交换法

离子交换法是以离子交换剂为固定相, 依据流动相中的待分离组分离离子与交换剂上的平衡离子进行可逆交换时结合力大小的差别而将混合物进行分离的一种提取方法。李立人等^[35]在 LOWE 的方法基础上, 加入 711 阴离子交换树脂作为小分子物质的吸附剂, 用二乙氨基 (DEAE) 纤维柱代替交联葡聚糖凝胶柱, 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液作为

匀浆液, 过柱洗脱后通过稀释结晶获得大量 FI 蛋白晶体。LING 等^[36]将壳聚糖 (CS) 和羧甲基纤维素 (CMC) 混合在水溶液中, 以戊二醛为交联剂, 二氧化硅颗粒为致孔剂, 制备了大孔两性离子交换膜 (CS/CMC 共混膜), 能够通过吸附-解吸过程从烟草提取液中分离蛋白质, 结果发现在 pH 6.15, 吸附时间为 8 h, 蛋白质初始浓度为 1.52 mg/mL, CS/CMC 重量为 0.05 g (质量比 4:1) 的条件下, 达到最大蛋白吸附量为 271.78 mg/g; 再调节 pH 至 9.40 以改变料液静电力, 实现较高的解吸能力和解吸效率, 成功从烟草提取液中分离出烟草蛋白, 且 CS/CMC 共混膜在 3 个吸附-解吸循环后仍显示出良好的可重复使用性。

3.2 双向电泳法

带电荷的供试品 (蛋白质粗提液) 在惰性支持介质 (如醋酸纤维素、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等) 中, 于电场的作用下, 向其对应的电极方向按各自的速度进行泳动, 使组分分离成狭窄的区带, 达到对不同目标物质的分离^[37]。溶液的 pH 决定了蛋白质的净电荷和解离程度, 当溶液的 $\text{pH} > \text{pI}$ 时, 蛋白质带负电, 当溶液的 $\text{pH} < \text{pI}$ 时, 蛋白质带正电; 溶液 pH 离 pI 越远, 粒子所带的电荷就越多, 移动得越快^[38]。双向电泳 (2-DE) 由横向等电聚焦电泳 (IEF) 和纵向 SDS-PAGE 组成, 是蛋白质组学中一种常见的分离技术^[39]。崔红等^[40]将 2-DE 与质谱 (MS) 结合使用, 以烟草栽培品种 K326 为材料, 对其在浓香型和清香型典型生态区的烟叶蛋白质表达谱进行比较研究, 结果发现有 51 个蛋白质在两个生态区发生了差异表达, 其中在河南 (浓香型典型生态区) 表达量上升的有 15 个 (NADH 脱氢酶、赤霉素-2 氧化酶等), 在福建 (清香型典型生态区) 表达量上升的有 25 个 (淀粉合成酶、Rps4 蛋白等), 初步探讨了不同生态区烟叶在蛋白质组学水平存在的差异及其对香气风格形成的影响。

4 根据蛋白质分子的配体专一性进行分离提取

亲和层析法是基于生物分子间天然特异性的相互识别, 具有高度选择性, 可以从大量复杂溶液中分离少量的包括抗体在内的特定蛋白质的一种提取方法。DAVOODI-SEMIROMI 等^[41]将霍乱毒素

B 亚基基因 (Cholera toxin-B subunit, CTB) 分别与恶性疟原虫的顶端膜抗原-1 基因 (Apical membrane antigen-1, AMA1) 和裂殖子表面蛋白-1 基因 (Merozoite surface protein-1, MSP1) 进行融合构建表达载体并转化烟草叶绿体后, 利用霍乱毒素 (CT) 能与 B 亚基介导的 Ni^{2+} 离子特异性结合的特点, 使用 TALON Superflow 金属亲和树脂 (Clontech, Mountain View, CA, USA) 进行固相金属亲和层析 (IMAC) 提取融合蛋白, 发现 CTB-AMA1 和 CTB-MSP1 的表达量分别占 TSP 的 13.17% 和 10.11%。通过皮下注射纯化的抗原或用烟草叶片饲喂小鼠后, 发现叶绿体表达的 CTB-AMA1 和 CTB-MSP1 具有免疫原性。NASAB 等^[42]为了从转质体烟草植株中分离纯化重组组织纤溶酶原激活剂 (rtPA) 蛋白, 将 6 个组氨酸和 1 个 Xa 因子蛋白酶位点序列与截短型组织纤溶酶原激活剂 (K2S) 蛋白序列的 C-端进行融合构建表达载体并转化到烟草叶绿体, 完成组氨酸标记, 利用带负电的组氨酸标记蛋白能与固相化金属离子介质 Ni^{2+} 离子特异性结合的特点, 使用 Ni-NTA 琼脂糖树脂进行 IMAC 提取纯化组氨酸标记的 rtPA, 然后将纯化的样品用蛋白酶因子 Xa (Sigma Cat. No. F9302) 处理, 并在 37 °C 下孵育 2.5 h 以去除组氨酸标记, 最终每 100 mg 鲜质量的叶片组织得到 30.6 μg rtPA, 约占 TSP 的 1%。

5 其他提取方法

烟草叶蛋白的提取方法还有直接加热法、泡沫分离法、硫酸铵沉淀等, 也有将多种提取方法综合在一起使用的。直接加热法操作简单、成本较低, 将烟叶磨碎或在加有还原剂的情况下, 把已粉碎的浆状物加热到 50 °C 左右热凝聚, 用高速离心去除脂溶性叶绿素部分, 将含有所需蛋白质的液体从匀浆中分离出来, 冷却后产生 FI 蛋白结晶^[5]。泡沫分离法是根据表面吸附原理, 利用通气在液相中形成的气泡为载体, 对液相中的溶质或颗粒进行分离, CROFCHECK 等^[43]利用组氨酸标记蛋白 (His-protein) 能与表面活性剂和金属离子形成复合物的特点, 选择组氨酸标记的 β -葡萄糖醛酸苷酶 (His-gus) 为目标蛋白, 在烟草提取液中加入 N- ϵ -dodecylamido-N- α , N- α -bis(carboxymethyl)-L-lysine (DCL) 表面活性剂和 Ni^{2+} 离子, 然后经过泡沫

分馏装置产生的气泡进行分离纯化, 最终得到 His-gus 的回收率为 88%, 浓缩比 (泡沫中蛋白质的浓度与初始溶液的蛋白质浓度的比值) 为 2.27。硫酸铵沉淀是利用不同浓度硫酸铵溶液对蛋白质进行沉淀和分离的方法, 通常与其他提取技术组合使用; 徐凡等^[44]为提取纯化烟草叶片中的谷草转氨酶 (GOT), 先后经过硫酸铵沉淀、Sephadex G-100 凝胶过滤和 DEAE-Sephadex 阴离子交换层析重复分离纯化后, 最终 GOT 的得率为 1.4%。

6 展 望

近年来, 随着现代生物化学技术的飞速发展, 蛋白质分离提取技术也取得了长足的进步。酸碱沉淀法、有机溶剂提取法、盐析法等传统提取技术可以粗略地分离目标蛋白, 但存在分辨率低、杂质多、操作较为繁琐等缺点。层析法、电泳法属于高精度分离技术, 可以进一步纯化蛋白质, 但获得的纯化蛋白质量少。而超滤膜分离、双水相萃取等现代分离提取方法具有高效、快速、自动化等优势, 已成为目前烟草蛋白质大量分离纯化的主流技术, 得到广泛应用。另外, 利用烟草生物反应器生产外源重组蛋白是一个有吸引力的廉价生产系统, 可以用来生产一系列的药用蛋白^[45], 包括抗体、疫苗和细胞因子等, 具有成本低、安全性好、表达产物具有与高等动物细胞一样的免疫原性和生物活性等优点^[46], 但目前尚存在目标蛋白表达量低、稳定性较差、口服疫苗易耐受等问题。单一的分离技术通常无法得到较好的提取效果, 但如果根据目标蛋白特性, 组合多种分离技术, 合理设计分离提取工艺, 就能实现理想的分离纯化效果。随着新理论、新材料和新思路的涌现, 新型分离技术将会向集成化、智能化、小型化的方向发展, 其在烟草叶蛋白分离提取方面也将具有不可估量的潜力。

参考文献

- [1] 王承福, 赵爽, 葛永辉, 等. 烟草综合利用及研究进展[J]. 贵州农业科学, 2016, 44 (11) : 37-41.
WANG C F, ZHAO S, GE Y H, et al. Progress in comprehensive utilization of tobacco[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2016, 44(11): 37-41.
- [2] VANSUYT G, SOUCHE G, STRACZEK A, et al. Flux of protons released by wild type and ferritin over-expressor tobacco plants: effect of phosphorus and iron nutrition[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2003, 41(1): 27-33.
- [3] 董二慧, 谭红, 何锦林, 等. 响应曲面法优化低次烟叶可溶性蛋白提取工艺[J]. 江苏农业科学, 2013, 41 (2) : 235-238.

- DONG E H, TAN H, HE J L, et al. Extraction optimization for soluble protein in low-grade tobacco leaves by response surface methodology[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2013, 41(2): 235-238.
- [4] 张劲松, 高学云, 黄镇, 等. 沉淀离子强度对烟草 Rubisco 结晶的影响[J]. 中国烟草科学, 1997, 18 (3) : 1-5.
- ZHANG J S, GAO X Y, HUANG Z, et al. Effect of precipitation ionic strength on Rubisco crystallization in tobacco[J]. Chinese Tobacco Science, 1997, 18(3): 1-5.
- [5] 郭俊成, 苏勇, 刘强, 等. 烟草叶蛋白利用价值研究进展[J]. 中国烟草科学, 2006, 27 (1) : 8-10.
- GUO J C, SU Y, LIU Q, et al. Research progress on utilization value of tobacco leaf protein[J]. Chinese Tobacco Science, 2006, 27(1): 8-10.
- [6] 李莹, 李钟, 郭培国. 烟草中主要生物活性成分的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27 (12) : 2157-2163.
- LI Y, LI Z, GUO P G. Research progress on the bio-active components of *Nicotiana tabacum* L.[J]. Natural Product Research and Development, 2015, 27(12): 2157-2163.
- [7] 吴芳, 聂荣邦. 烟叶硒蛋白及富硒烟叶研究进展[J]. 作物研究, 2007, 21 (5) : 722-724.
- WU F, NIE R B. Research progress on selenoprotein and selenium enriched tobacco leaves[J]. Crop Research, 2007, 21(5): 722-724.
- [8] COVENTRY H S, DUBERY I A. Lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia* contribute to an enhanced defensive capacity and the induction of pathogenesis-related proteins in *Nicotiana tabacum*[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2001, 58(4): 149-158.
- [9] 赵谋明, 饶国华, 林伟锋. 烟草蛋白质研究进展[J]. 烟草科技, 2005, 38 (4) : 31-34.
- ZHAO M M, RAO G H, LIN W F. Advance in tobacco protein[J]. Tobacco Science & Technology, 2005, 38(4): 31-34.
- [10] 闫宁, 刘艳华, 张忠锋. 烟草生物反应器生产药用蛋白的研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 30 (31) : 57-63.
- YAN N, LIU Y H, ZHANG Z F. Research advances in tobacco bioreactor for production of therapeutic proteins[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(31): 57-63.
- [11] 廖莎, 李国玲, 吴珍芳, 等. 转基因动植物生物反应器研究进展及应用现状[J]. 广东农业科学, 2018, 45 (11) : 126-136.
- LIAO S, LI G L, WU Z F, et al. Research progress and application status of transgenic animal and plant as bioreactors[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2018, 45(11): 126-136.
- [12] 方宁, 王春凯, 刘晓峰, 等. 适于烟草生物反应器的真核生物源虾青素合成酶筛选[J]. 中国烟草科学, 2019, 40 (1) : 9-16.
- FANG N, WANG C K, LIU X F, et al. Identification of eukaryotic enzymes compatible with tobacco bioreactor for astaxanthin synthesis[J]. Chinese Tobacco Science, 2019, 40(1): 9-16.
- [13] 李军营, 缪立新, 李飞, 等. 烟草叶片发育过程中 FI 蛋白含量变化及与光合作用的关系[J]. 江苏农业科学, 2017, 45 (2) : 86-89.
- LI J Y, MIAO L X, LI F, et al. Changes of FI protein content during tobacco leaf development and its relationship with photosynthesis[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(2): 86-89.
- [14] 郭培国, 李荣华, 陈建军. 烟叶中 FI 蛋白的简捷提取技术及其氨基酸成分分析[J]. 中国烟草学报, 2000, 6 (2) : 16-19.
- GUO P G, LI R H, CHEN J J. The extraction of Fraction I protein from tobacco leaves and its amino acid composition analysis[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2000, 6(2): 16-19.
- [15] 徐卓, 陈震, 吴桂成, 等. 长江下游农区金花菜叶蛋白提取工艺优化及关键参数特征[J]. 草业科学, 2020, 37 (5) : 993-1001.
- XU Z, CHEN Z, WU G C, et al. Optimization of leaf protein extraction process and key parameters of *Medicago polymorpha* in the agricultural areas of Lower Yangtze River[J]. Pratacultural Science, 2020, 37(5): 993-1001.
- [16] 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.
- ZHANG H. Protein separation methods of several cereal plants[J]. Grain Science and Technology and Economy, 1997(4): 40-42.
- [17] 赵谋明, 饶国华, 林伟锋, 等. 低次烟叶中蛋白质提取工艺优化及氨基酸分析研究[J]. 农业工程学报, 2006, 22 (1) : 142-146.
- ZHAO M M, RAO G H, LIN W F, et al. Optimization of extraction technology and amino acid analysis of protein extracted from discarded tobacco leaf[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2006, 22(1): 142-146.
- [18] 田少君, 张磊. 烟叶叶蛋白的提取研究[J]. 食品科技, 2005 (5) : 15-17.
- TIAN S J, ZHANG L. Study on the extraction of tobacco leaf protein[J]. Food Science and Technology, 2005(5): 15-17.
- [19] 卫青, 吴平艳, 段孟, 等. 再造烟叶浓白水中蛋白质提取工艺的优化研究[J]. 安徽农业科学, 2016, 44 (30) : 67-69, 89.
- WEI Q, WU P Y, DUAN M, et al. Optimization of protein extraction technology of concentrated white water of reconstituted tobacco[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(30): 67-69, 89.
- [20] HURKMAN W J, TANAKA C K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis[J]. Plant Physiology, 1986, 81(3): 802-806.
- [21] 韦玉梅, 李佳素, 周杰, 等. 烟草叶片蛋白 3 种提取方法的比较研究[J]. 湖北农业科学, 2011, 50 (23) : 4968-4970.
- WEI Y M, LI J S, ZHOU J, et al. Comparison study on three methods for tobacco leaf protein extraction[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2011, 50(23): 4968-4970.
- [22] 尤垂淮, 唐莉娜, 王海斌, 等. 烟草叶片蛋白质双向电泳技术体系的建立[J]. 中国烟草学报, 2012, 18 (5) : 96-102.
- YOU C H, TANG L N, WANG H B, et al. Establishment of two-dimensional gel electrophoresis of proteins from tobacco leaves[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2012, 18(5): 96-102.
- [23] DAMERVAL C, VIENNE D D, ZIVY M, et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat - seedling proteins[J]. Electrophoresis, 1986, 7(1): 52-54.
- [24] 王绍美, 罗成刚, 刘贯山, 等. 烟草叶片蛋白质组双向电泳实验体系的建立[J]. 中国烟草科学, 2012, 33 (6) : 54-60.
- WANG S M, LUO C G, LIU G S, et al. Establishment of two-dimensional electrophoresis protocol for tobacco leaf proteome[J]. Chinese Tobacco Science, 2012, 33(6): 54-60.
- [25] 闫永胜, 遼洋, 韩娟, 等. 聚合物-盐双水相技术及研究进展[J]. 吉林师范大学学报(自然科学版), 2014, 35 (3) : 6-16.
- YAN Y S, LU Y, HAN J, et al. Polymer-salt aqueous two-phase technology and its research progress[J]. Jilin Normal University Journal(Natural Science Edition), 2014, 35(3): 6-16.
- [26] BALASUBRAMANIAM D, WILKINSON C, VAN COTT K, et al. Tobacco protein separation by aqueous two-phase extraction[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 989(1): 119-129.
- [27] ROSS K C, ZHANG C M. Separation of recombinant β -glucuronidase from transgenic tobacco by aqueous two-phase extraction[J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 49(3): 343-350.
- [28] 刘一静, 刘继, 张弛松, 等. 桑叶蛋白的功能和提取研究进展[J]. 安徽农业科学, 2017, 45 (5) : 89-91.
- LIU Y J, LIU J, ZHANG C S, et al. Research progress on the function and extraction of mulberry leaf protein[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(5): 89-91.
- [29] SHI W Y, LI H B, ZENG X H, et al. The extraction of tobacco protein from discarded tobacco leaf by hollow fiber membrane integrated process[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2019, 58: 102245.
- [30] 魏赫楠, 谭红, 朱平, 等. 烟草中蛋白质超滤提取工艺研究[J]. 河南农业科学, 2013, 42 (11) : 154-157.
- WEI H N, TAN H, ZHU P, et al. The protein extraction in tobacco with ultrafiltration[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2013, 42(11): 154-157.
- [31] HEIDARI-JAPELAGHI R, VALIZADEH M, HADDAD R, et al. Production of bioactive human IFN- γ protein by agroinfiltration in tobacco[J]. Protein Expression and Purification, 2020, 173: 105616.
- [32] SEDAGHATI B, HADDAD R, BANDEHPOUR M. Transient expression of human serum albumin (HSA) in tobacco leaves[J]. Molecular Biology Reports, 2020, 47(9): 7169-7177.

- [33] LOWE R H. Crystallization of fraction I protein from tobacco by a simplified procedure[J]. *Febs Letters*, 1977, 78(1): 98-100.
- [34] 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, 128.
CHEN M D, DING Y, JU M L, et al. Progress on tobacco protein[J]. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 2009, 13(6): 50-52, 128.
- [35] 李立人, 王维光. 烟草 (*Nicotiana tabacum*) 部分 I 蛋白结晶的三种简易制备方法[J]. *植物生理学报*, 1985, 11 (1) : 110-112.
LI L R, WANG W G. Three simple methods for preparation of Fraction I protein crystallization in tobacco (*Nicotiana tabacum*)[J]. *Plant Physiology Journal*, 1985, 11(1): 110-112.
- [36] LING J, LI Y X, ZHOU B, et al. The amphoteric ion exchange membrane based on CS/CMC for tobacco-protein adsorption and separation from tobacco extract[J]. *International Journal of Polymer Science*, 2019(6): 3261798.
- [37] 柳青海, 张唐伟, 李天才. 叶蛋白提取分离及应用研究进展[J]. *食品工业科技*, 2011, 32 (9) : 468-471.
LIU Q H, ZHANG T W, LI T C. Review on extraction, purification and application of leaf protein[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2011, 32(9): 468-471.
- [38] LIU S X, LI Z H, YU B, et al. Recent advances on protein separation and purification methods[J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2020, 284: 102254.
- [39] YANG J H, ZHENG N, YANG Y X, et al. Detection of plant protein adulterated in fluid milk using two-dimensional gel electrophoresis combined with mass spectrometry[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2018, 55(7): 2721-2728.
- [40] 崔红, 冀浩, 张华, 等. 不同生态区烟草叶片蛋白质组学的比较[J]. *生态学报*, 2008, 28 (10) : 4873-4880.
- CUI H, JI H, ZHANG H, et al. Comparative analysis of leaf proteomes between tobacco plants growing in different ecological regions of China[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(10): 4873-4880.
- [41] DAVOODI-SEMIROMI A, SCHREIBER M, NALAPALLI S, et al. Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2010, 8(2): 223-242.
- [42] NASAB M A, JAVARAN M J, CUSIDO R M, et al. Purification of recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) protein from transplastomic tobacco plants[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 108: 139-144.
- [43] CROFCHECK C, MAITI I, PATTANAIK S, et al. Effect of ion and surfactant choice on the recovery of a histidine-tagged protein from tobacco extract using foam fractionation[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2004, 119(1): 79-91.
- [44] 徐凡, 吴媚. 烟草谷草转氨酶纯化及部分酶学性质分析[J]. *广东农业科学*, 2013 (10) : 146-148, 175.
XU F, WU M. Purification of glutamic-oxaloacetic transaminase from tobacco and part of its characteristics[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2013(10): 146-148, 175.
- [45] 张剑锋, 李阳, 金静静, 等. 烟草叶绿体基因工程研究进展[J]. *烟草科技*, 2017, 50 (6) : 88-98.
ZHANG J F, LI Y, JIN J J, et al. Recent advances in tobacco chloroplast genetic engineering[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2017, 50(6): 88-98.
- [46] 刘培磊, 李宁, 连庆, 等. 利用植物生物反应器生产药用蛋白的研究进展[J]. *生物技术进展*, 2013, 3 (5) : 309-316.
LIU P L, LI N, LIAN Q, et al. Progress in using plant bioreactor to produce pharmaceutical proteins[J]. *Current Biotechnology*, 2013, 3(5): 309-316.

《中国烟草学报》2021年第4期目次

1	冬虫夏草菌株发酵对非主料区烟叶感官品质和化学成分的影响.....	张倩颖, 耿宗泽, 邓羽翔, 等
10	基于感官导向的铁观音茶叶特征香气的分析、重构及在卷烟加香中的应用.....	操晓亮, 刘加增, 柴国璧, 等
20	粗糙集在烤烟化学质量综合评价中的应用.....	褚旭, 胡宗玉, 王珂清, 等
28	燃煤型密集烤房污染物排放及脱硫除尘研究.....	陈振国, 孙光伟, 陈祥, 等
36	密集烤房内内置式生物质供热炉体的设计与试验.....	王建安, 范艺宽, 张同庆, 等
45	打叶复烤自动化精准配方投料设备的设计与应用.....	楚晗, 张长安, 王文杰, 等
51	采后烟叶颜色变化与能量代谢的关系.....	牛浩, 段卫东, 汪代斌, 等
59	外源添加肉桂醛提高烟草幼苗抵御盐胁迫机理的研究.....	刘晓涵, 王悦霖, 宋佳倩, 等
66	晒烟品种塘蓬烟抗白粉病基因的等位性测定和序列分析.....	林世锋, 王仁刚, 潘飞, 等
74	烟草 <i>NiMHX1</i> 和 <i>NiMHX2</i> 基因的克隆及不同金属离子胁迫下的表达模式分析.....	张吉顺, 张孝廉, 杨慧, 等
83	面向烟草领域的科研知识图谱服务平台关键技术研究.....	王卫军, 李娜, 郑新章, 等
92	基于混频模型的中部某省卷烟销量趋势预测.....	石涛, 李根栓, 李鹏飞, 等
100	雪茄烟气化学成分研究进展.....	杨涓, 罗诚, 李东亮, 等
106	烟草漂浮育苗有害藻类致病机制及其防治研究进展.....	崔江宽, 常栋, 万笑迎, 等
114	云烟净油有机膜分离成分中关键香气成分与感官属性的关联分析.....	许春平, 曲利利, 杜欢哲, 等
122	本氏烟转录因子 bZIP60 多克隆抗血清的制备及其应用.....	张浩, 庄新建, 郭泉, 等