

低次烟叶中的类胡萝卜素降解研究

许春平, 杨琛琛, 王铮, 毛多斌

(郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001)

摘要: 分别利用生物法和物理法处理低次烟叶, 降解烟叶中的类胡萝卜素. 生物法是从烟草土壤中分离得到能够有效降解 β -胡萝卜素的丝孢酵母. GC-MS分析表明, 该酵母可以彻底降解 β -胡萝卜素. 物理法是用臭氧处理低次烟叶, GC-MS分析发现烟叶中的类胡萝卜素和叶绿素a含量随处理时间延长先下降后趋平稳; 而且臭氧处理后, 烟叶中尼古丁、新植二烯、碳十八酸的含量有所减少, 醇类、酯类和酮类化合物在总量上均有提升, 可起到醇和烟香、减轻刺激的作用.

关键词: 低次烟叶; 丝孢酵母; 臭氧处理; 类胡萝卜素

中图分类号: TS49 文献标志码: A DOI: 10.3969/j.issn.2095-476X.2013.06.001

Study on degradation of carotenoids in discarded tobacco leaves

XU Chun-ping, YANG Chen-chen, WANG Zheng, MAO Duo-bin

(College of Food and Bioengineering Zhengzhou University of Light Industry Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Degradation of carotenoids in discarded tobacco leaves by biological and physical treatments was investigated. Biological treatment was to isolate a strain to effectively degrade β -carotene and this strain was identified a yeast *Trichosporon*. GC-MS analysis showed that this yeast could completely degrade β -carotene. The physical method was to treat discarded tobacco leaves by ozone. GC-MS analysis showed that the contents of carotenoid and chlorophyll increased during the processing time firstly, then decreased and became stable. Moreover, after ozone treatment, the contents of alcohols, esters and ketones in tobacco were raised, and the content of nicotine, neophytadiene and carbon stearic acid were reduced to mellow tobacco aroma and reduce irritancy.

Key words: discarded tobacco leaf; *Trichosporon* yeast; ozone treatment; carotenoids

0 引言

烟草色素的含量过高不仅会直接影响烟叶的外观质量, 而且还会间接地影响烟叶的内在品质. 类胡萝卜素作为许多重要致香成分的前提物, 对烟香气味品质的形成具有重要作用. 生物法主要指利用微生物的分解作用, 包括真菌、细菌或者某种酶制剂将类胡萝卜素降解转化成有用的小分子香味

物质或某种香料前提物. 类胡萝卜素的生物氧化降解反应及酶催化氧化降解反应是重要的香气物质生成途径^[1]. 类胡萝卜素的生物降解因其条件温和且效率高而越来越受到关注. 近年来有学者尝试利用 O_3 处理均质烟, 成功地降低了烟气中多核芳香族碳氢化合物的水平. 经过 O_3 处理后, 烟叶内化学成分与 O_3 反应会产生大量的过氧化物中间产物——臭氧氧化物, 而这些臭氧氧化物极不稳定, 经分

收稿日期: 2013-07-03

基金项目: 国家人社部“留学人员科技项目择优支持计划”(豫留学函[2010]16号)

作者简介: 许春平(1977—), 男, 河南省焦作市人, 郑州轻工业学院教授, 博士, 主要研究方向为生物催化与烟草工程.

解和重组会产生大量易挥发的醛、酮和酸类^[2],有助于降低烟气中令人不愉快的化学组分前提物的浓度^[3].

本文以烟草土壤和腐烂的胡萝卜组织为筛选目标,选出有利于 β -胡萝卜素降解的微生物,通过生物法和物理法降解低次烟叶中类胡萝卜素,以期有效提升低次烟叶的品质,并对非低次烟叶的品质提升提供参考.

1 实验

1.1 材料与仪器

材料:吉林长春产晒红烟 Y23,2008 年产,等级为 3 级,由瑞升烟草技术(集团)有限责任公司提供.

试剂:葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、琼脂粉,北京奥博星生物技术有限责任公司产;磷酸二氢钾、硫酸铵、硫酸亚铁、硫酸镁,广东汕头市西陇化工厂产;二氯甲烷,天津市富宇精细化工有限公司产;以上试剂均为分析纯.甲醇,色谱级,天津市富宇精细化工有限公司产; β -胡萝卜素,纯度 $\geq 98\%$,郑州恒丰生物科技有限公司产.

仪器:2540 型台式灭菌器、3260 型立式灭菌器,山东新华医疗器械股份有限公司产;QYC200 型恒温振荡摇床、DGX-9143 型电热恒温鼓风干燥箱,上海福玛实验设备有限公司产;Q-100A3 型旗箭粉碎机,上海冰都电器有限公司产;HS-4 型恒温水浴锅,上海医疗器械五厂产;UV1700 型紫外可见分光光度计,上海凤凰光科学仪器有限公司产;PL203 型电子分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产;QL-866 型涡旋混合仪,海门市其林贝尔仪器制造有限公司产;6890/5973 型气相色谱仪/质谱仪,安捷伦科技有限公司产;CF-16RX II 型冷冻离心机,Hitachi(日立)公司产;PB-10 型 pH 计,德国赛多利斯股份公司产;RE-52AA 型旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂产;SHB-3 型循环水多用真空泵,郑州杜甫仪器厂产;1525/2998 型 Waters 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司产.

1.2 实验方法

1.2.1 生物法

1.2.1.1 培养基及底物的配制

1) 培养基的配制.富集培养基:牛肉膏 5 g/L,蛋白胨 10 g/L,氯化钠 5 g/L;基本液体培养基: KH_2PO_4 1 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, MgSO_4 0.5 g/L,

FeSO_4 0.01 g/L;PDA 培养基:马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L;种子活化培养基:酵母粉 10 g/L,牛肉膏 10 g/L,NaCl 30 g/L,葡萄糖 0.2 g/L;发酵基本培养基^[4]:酵母粉 5.5 g/L,NaCl 30 g/L.

2) 底物的配制^[5-6].以 12.5 g 吐温 40 作为增溶剂,准确称取 β -胡萝卜素 125 mg,溶于 200 mL 二氯甲烷中,减压浓缩,充分除去二氯甲烷,即得分散均匀的 β -胡萝卜素,将其加入到已灭菌过的基本培养基中,混匀,倒平板,即为筛选培养平板.

1.2.1.2 β -胡萝卜素降解微生物的筛选

1) 初筛.分别取适量土壤和腐烂胡萝卜组织于 100 mL 三角瓶中,加入无菌水浸泡 2 h,过滤,取滤液 1 mL 加到富集培养基中,于 37 °C,转速 150 r/min 下,摇床培养 2 d;于无菌操作台中选择上述富集培养液中生长较好的菌液,取适量进行梯度稀释,选择 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 这 3 个浓度梯度进行平板涂布,每个浓度梯度平行涂布 3 个平板,同时对不含有底物 β -胡萝卜素的平板进行涂布作为对照组.将涂布好的平板于 28 °C 培养箱中培养 2—5 d,然后挑选出菌落分布均匀、有单菌落产生的平板,保藏在冰箱中备用.

2) 复筛.挑选出形态较好,周围有轻微褪色的单菌落,于无菌操作台将其接种于液体基本培养基中,于摇床中 37 °C 进行培养;选择生长较好的菌液进行梯度稀释,选择 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 这 3 个浓度梯度进行平板涂布和划线.同时在基础培养平板(不含 β -胡萝卜素)上进行涂布作为对照组.置于 28 °C 培养箱中培养 2—5 d;与对照组对比,挑选出透明圈较为明显的单菌落于无菌操作台中接种于制备好的 PDA 试管培养基中,放于冰箱中备用.

1.2.1.3 菌株的发酵培养

1) 筛选菌株的摇瓶发酵.取筛选得到的菌种接种于制备好的种子活化培养基中,每个菌株接种 2 瓶,于 37 °C,150 r/min 条件下摇床培养 2 d,即得活化种子液.取培养好的种子培养上清液 1 mL 注入已灭菌的发酵培养基中进行发酵培养.其中每个菌株设定 3 个平行实验组,同样条件下培养 2 d 之后,加入 β -胡萝卜素底物进行培养;同时以培养基相同但不加底物的摇瓶作为对照 1,以培养基成分相同,添加底物但不接种菌株的摇瓶为对照 2.同样条件下,避光摇床培养 4 d.

2) 发酵液萃取.取上述发酵好的培养液,于

250 mL 分液漏斗中加入等体积的二氯甲烷,缓缓摇晃,使两相混合均匀,静置 10 min 后收集有机相,重复以上步骤 3 次,合并有机相,旋转蒸发除去二氯甲烷后,加入 1 mL 甲醛溶解,过 0.22 μm 有机滤膜后,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温储存备用,以上操作均在避光环境中进行。

1.2.1.4 高效液相色谱检测 色谱分析条件: 色谱柱 symmet[®] C18 3.5 μm \times 4.6 mm \times 75 mm; 流动相: 甲醇: 水 = 95: 5, 检测器波长设置 270 nm, 447 nm, 单样手动进样, 进样体积 10 μL 。

1.2.1.5 质谱仪对有效菌株的初步鉴定

1) 样品前处理: 取适量(5 ~ 10 mg) 样品, 加入 300 μL 水, 仔细混匀, 再加入 900 μL 无水乙醇, 仔细混匀, 高速离心 2 min, 弃去上清, 加入 50 μL 70% 甲酸, 仔细混匀, 再加入 50 μL 乙腈, 仔细混匀, 高速离心 2 min, 吸出上清液, 点 1 μL 上清液置 MALDI 样品靶上, 放干后点 1 μL 基质溶液, 即可用测定。

2) 数据处理: 通过 Biotyper 数据库检索鉴定。

1.2.2 物理法

1) 臭氧处理低次烟叶. 称取适量粉碎过的烟末, 分成等质量的 5 份, 其中 1 份不做任何处理, 作为空白对照; 其余 4 份分别置于敞口小烧杯中, 使用臭氧发生器分别熏制处理 15 min, 30 min, 45 min, 60 min. 实验操作在避光且空气流通的环境中进行。

2) 分光光度法检测低次烟叶中色素的变化. 用丙酮-乙醇混合液法对烟叶中的类胡萝卜素含量进行测定^[7]. 分别称取臭氧处理过的烟末 0.1 g, 加入丙酮-乙醇混合液(体积比 1:1) 5 mL, 保鲜膜封口, 温室暗处理 5 h. 将提取液过滤后, 分别于 645 nm, 663 nm, 470 nm 测定吸光度. 色素含量和叶绿素 a, 叶绿素 b 及类胡萝卜素浓度 C_a , C_b , C_x 的计算公式为:

色素含量 = (色素浓度 \times 提取液体积) / 叶片质量

$$C_a = 12.71A_{663} - 2.59A_{645}$$

$$C_b = 22.88A_{645} - 4.67A_{663}$$

$$C_x = (1000A_{470} - 2.05C_a - 114.8C_b) / 245$$

3) 气质联用分析低次烟叶中化学成分的变化. 分别称取实验组和对照组烟丝各 25 g, 置于 250 mL 圆底烧瓶中, 加入 0.6 mg/mL 乙酸苯乙酯 1 mL 作为内标物, 放入同时蒸馏萃取装置中, 用二氯甲烷作为溶剂, 连续动态萃取 2 h. 所得二氯甲烷萃取物用无水硫酸钠干燥过夜, 过滤后, 减压蒸发浓缩至 1 mL, 采用内标法定量。

色谱条件: HP-5 色谱柱 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm ; 载气为氦气, 流速为 1 mL/min; 程序升温 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 保持 1 min, 以 $8\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升温速度升至 $160\text{ }^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min, 继续以 $8\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升温至 $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ 并保持 15 min. 进样量为 2 μL , 分流比为 25:1。

MS 分析条件: 溶剂延迟 5 min, 扫描范围 35 ~ 455 aum, 传输线温度 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$, EI 能量 70 eV, 离子源温度 $230\text{ }^{\circ}\text{C}$, 四级杆温度 $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与讨论

2.1 类胡萝卜素降解微生物的筛选结果及降解效果分析

通过大量的初筛和复筛, 选择可能的菌种添加于 β -胡萝卜素标品进行液体发酵. 结合 HPLC 对发酵产物进行分析, 结果见图 1. 由图 1 可知, 有 1 株菌对 β -胡萝卜素具有明显的降解作用, 但对进一步对提取液进行气相分析并未发现新的香味代谢物. 这与 H. Zorn 等^[8] 的研究结果相似. 推测其原因可能是: 该菌对 β -胡萝卜素的代谢过于彻底, 将其降解为小分子的 CO_2 和 H_2O , 因此没有检测出新的香味代谢产物。

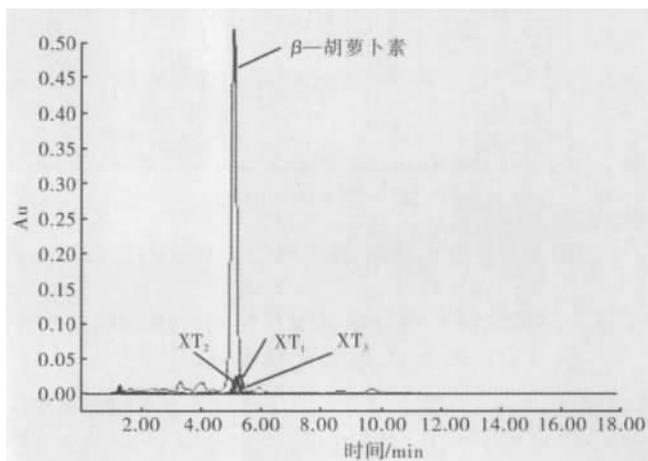


图 1 筛选菌株转化 β -胡萝卜素发酵产物液相色谱图

2.2 质谱仪对有效菌株的初步鉴定分析

虽然筛选出的微生物菌株不能转化 β -胡萝卜素产生新的香味物质, 但其对 β -胡萝卜素的降解效果明显, 因此, 对该菌株进行了质谱分析, 结果见图 2. 通过数据库检索发现, 筛选菌株为丝孢酵母。

2.3 臭氧处理对烟叶中类胡萝卜素的影响

将臭氧处理过的烟末按照物理法提取色素并

在紫外-可见分光光度计上检测,结果见图3。由图3可知,随着臭氧处理时间的增加,烟叶中的叶绿素b含量变化不明显,而类胡萝卜素和叶绿素a均呈现先减少后趋于平稳的趋势,在30 min时类胡萝卜素和叶绿素a含量达到基本稳定。

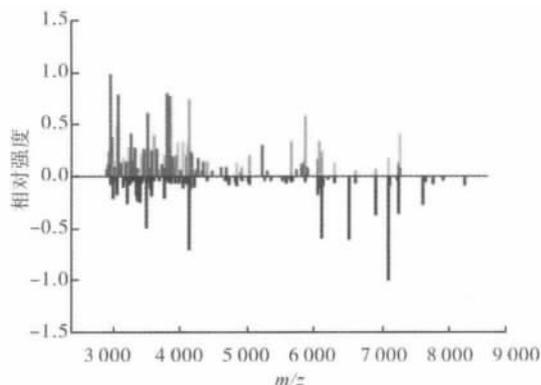


图2 筛选菌株 MALDI TOF 质谱图

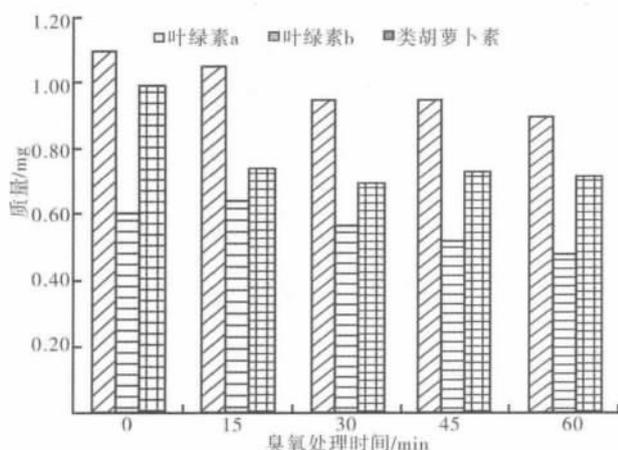


图3 臭氧处理后烟叶中色素含量的变化

2.4 臭氧处理对烟叶中其他化学成分的影响

对臭氧处理过的烟叶按照物理法做进一步分析,结果见表1。由表1可知,烟叶中化合物主要为醇、酮、酯、酸类化合物和新植二烯,其中后者含量大、作用显著。经臭氧处理后,尼古丁、新植二烯、碳十八酸的含量有所减少,而醇类、酯类和酮类化合物在总量上均有提升,对烟草的香气和吸味有重要的贡献。如植醇能增加卷烟的清香,芳樟醇具有浓青带甜的木青气息,能够增加烟气的木香、果香气息;柠檬酸三乙酯、肉豆蔻酸甲酯、二氢猕猴桃内酯等能够使烟气变得醇和,可起到减轻刺激、丰满烟香的作用; β -大马酮赋予烟叶花香和天然的甜香感,是充分成熟烟草的特征香味,这些物质对烟草的香气都具有重要的贡献。另外,臭氧处理后烟叶

中增加了少量3-羟基月桂酸、2-苯乙基己酸酯、2,6,11-三甲基十二烷、2-十八烷基乙醇4种化学成分。

表1 臭氧处理前后烟叶中化学成分的变化

化合物名称	浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	
	对照组	试验组
1-甲基-2-吡咯烷酮	10.75	35.51
2-环戊烯-1,4-二酮	0.02	0.23
3-羟基月桂酸	—	1.22
2-苯乙基己酸酯	—	0.78
2,6,11-三甲基十二烷	—	1.43
2-十八烷基乙醇	—	0.25
尼古丁	2.76	0.65
2,6,20,15-四甲基十七烷	0.05	2.17
芳樟醇	0.57	2.26
6-甲基正十八烷	0.10	0.49
4-(3-羟基-1-丁烯基)-3,5,5-三甲基-2-环己烯酮	0.74	1.22
柠檬酸三乙酯	1.26	3.56
植醇	34.95	53.62
茄酮	5.31	12.89
β -大马酮	3.12	4.73
十五烷酮	5.78	20.21
3-乙基-5-(2-乙丁基)-正十八烷	2.17	4.45
肉豆蔻酸甲酯	2.12	3.66
乙基异胆甾醇	1.09	1.45
(4E,8E,13Z)-1,5,9-三甲基-12-(1-甲基乙基)-环十四碳-4,8,13-三烯-1,3-二醇	9.20	6.17
十八碳烯酰胺	22.42	0.32
1-甲基-5-(3-吡啶基)-2-吡咯烷酮	1.36	7.56
二氢猕猴桃内酯	1.12	2.86
巨豆三烯酮	2.02	1.75
9,12,15-十八碳三烯酸	2.30	1.32
新植二烯	110.7	90.87
正十八烷酸甲酯	8.77	22.86
十八碳烯酰胺	1.29	22.60
亚麻酸甲酯	15.69	10.23
肉桂酸苄酯	8.90	9.87
三十六烷	30.02	33.02
棕榈酸	29.14	36.97

3 结论

本文从生物法和物理法2个方面研究了烟叶中类胡萝卜素的降解。从烟草土壤中分离得到能够有效降解 β -胡萝卜素的丝孢酵母,但气相色谱分析表明,其降解后并未生成新的香味物质,这可能是

由于该菌对 β -胡萝卜素的利用过于彻底,将其充分降解为小分子的 CO_2 和 H_2O 的缘故.而用臭氧处理低次烟叶后,烟叶中的类胡萝卜素和叶绿素a含量随处理时间延长呈现先下降后趋平稳的趋势.进一步气相分析表明,烟叶中化合物主要为醇、酮、酯、酸类化合物和新植二烯.臭氧处理后,烟叶中尼古丁、新植二烯、碳十八酸的含量有所减少,而醇类、酯类和酮类化合物在总量上均有提升,后者可起到醇香烟气、减轻刺激的作用,对烟草的香气和吸味有重要的贡献.

参考文献:

- [1] Winterhalter P, Rouseff R. Carotenoid-derived aroma compounds [M]. Washington: ACS symposium series 2001.
- [2] 洗可法,沈朝智,戚万敏,等.云南烤烟中香味物质分析研究[J].中国烟草学报,1992(2):1.
- [3] Robledog M, Bustamante E R, Contreras A S, et al. Production of tobacco aroma from lutein: Specific role of the microorganisms involved in the process [J]. Applied Microbiology and Biotechnology 2003 62:484.
- [4] Eduardo R B, Gabriela M R, Marco A O, et al. Bioconversion of lutein using a microbial mixture-maximizing the production of tobacco aroma compounds by manipulation of culture medium [J]. Applied Microbiology and Biotechnology 2005 68:174.
- [5] 李秀红,李冰,李仙,等.一株产香微生物的筛选[C]//中国烟草学会工业专业委员会烟草化学学术研讨会论文集.海口:[s.n.]2005.
- [6] Schepartz A I, Mottola A C, Schlotzhuer W S, et al. Effect of ozone treatment of tobacco on leaf lipids and smoke PAH: A pilot plant trial [J]. Tobacco Science, 1995, 25:120.
- [7] 张宪政.作物生理研究法[M].北京:农业出版社,1992.
- [8] Zorn H, Langhoff S, Scheibner M, et al. Cleavage of β -carotene to flavor compounds by fungi [J]. Applied Microbiology and Biotechnology 2003 62:331.

本刊数字网络传播声明

本刊已许可中国学术期刊(光盘版)电子杂志社在中国知网及其系列数据库产品、万方数据资源系统、维普网等中以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。其相关著作权使用费与本刊稿酬一并支付。作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意我刊上述声明。